

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR**

**ESCUELA DE BIOANÁLISIS**

**DISERTACIÓN PREVIA PARA LA OBTENCIÓN DE TÍTULO DE BIOQUÍMICO  
CLÍNICO**

**“Identificación y caracterización de subtipos de *Escherichia coli* enteropatógena  
típica y atípica, aislados de muestras fecales de pacientes menores a 5 años de edad  
con cuadro diarreico agudo, en la ciudad de Quito, 2013.”**

**FRANCISCO XAVIER MORA TORO**

**DIRECTOR: ROLANDO XAVIER AVILÉS REYES, Ph.D.**

**QUITO, 2014**

## DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, FRANCISCO XAVIER MORA TORO, C.I. 110454745-8, autor del trabajo de graduación intitulado: “IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE SUBTIPOS DE *Escherichia coli* ENTEROPATÓGENA, AISLADOS DE MUESTRAS FECALES DE PACIENTES MENORES A 5 AÑOS DE EDAD CON CUADRO DIARREICO AGUDO, EN LA CIUDAD DE QUITO, 2013” previa a la obtención del grado académico de BIOQUÍMICO CLÍNICO en la Escuela de Bioanálisis:

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.



FRANCISCO XAVIER MORA TORO,

C.I. 110454745-8.

## DEDICATORIA

*A Dios*

*A mi familia.*

## **AGRADECIMIENTO**

Al realizar mis estudios universitarios y el desarrollo del trabajo de disertación de tesis, para la obtención del título de Bioquímico, quiero agradecer sinceramente a:

Mis padres, por haberme acompañado incondicionalmente en el transcurso de todos los años universitarios.

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, por la formación ética y profesional que me han dado.

A todos quienes conforman la facultad de Bioanálisis, por los conocimientos impartidos en todos estos años de estudio.

A mi director de tesis Dr. Rolando X. Avilés R. por haberme guiado a lo largo de todo esta investigación.

A todas aquellas personas que indirectamente estuvieron a mi lado durante la realización de este proyecto.

## TABLA DE CONTENIDOS

DEDICATORIA .....	iii
AGRADECIMIENTO.....	iv
ÍNDICE DE TABLAS .....	viii
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	ix
ÍNDICE DE ANEXOS .....	x
LISTA DE SIGLAS .....	xii
ABSTRACT .....	xiv
CAPITULO I.....	1
Introducción .....	2
1.1    Objetivos .....	5
1.1.1. Objetivo General .....	5
1.1.2. Objetivos Específicos .....	5
CAPITULO II .....	6
Marco Teórico .....	7
2.1 Antecedentes .....	7
2.2. Introducción .....	9
2.3. <i>Escherichia coli</i> .....	9
2.3.1. Generalidades .....	9
2.3.2. Serogrupo .....	10
2.3.2.1. Antígeno “O” .....	11
2.3.2.2. Antígeno “K” .....	11
2.3.2.3. Antígeno “H” .....	11
2.3.3. Patotipos .....	12
2.3.3.1. <i>Escherichia coli</i> entero toxigénica .....	13
2.3.3.2. <i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva.....	14
2.3.3.3. <i>Escherichia coli</i> entero hemorrágica .....	15
2.3.3.4. <i>Escherichia coli</i> entero-agregativa.....	16
2.3.3.5. <i>Escherichia coli</i> difuso adherente .....	16
2.4. <i>Escherichia coli</i> enteropatógena .....	16
2.4.1. Mecanismo patogénico.....	17
2.4.2. Filogenia de los subtipos típicos y atípicos:.....	17
2.5. <i>Escherichia coli</i> enteropatógena subtipo típico.....	18
2.5.1. Virulencia específica .....	18

2.6. <i>Escherichia coli</i> enteropatógena subtipo atípico.....	19
2.6.1. Virulencia específica .....	19
CAPITULO III .....	21
Marco Metodológico .....	22
3.1. Tipo de estudio .....	22
3.2. Población - Ambiente – Período .....	22
3.3. Prevalencia, estandarización y secuenciación. ....	22
3.4 Criterios de inclusión .....	23
3.5. Criterios de exclusión.....	23
3.6. Metodología .....	23
3.7. Tamaño muestral.....	23
3.8. Análisis de Densidad Óptica Relativa (DOR).....	24
3.9. Materiales .....	24
3.10 Recolección de muestras .....	24
3.11. Reconstitución bacteriana .....	25
3.12. Extracción y purificación de ADN.....	25
3.13. Cuantificación de pureza del ADN .....	26
3.14. Control de calidad .....	26
3.14.1. Límite de detección. ....	26
3.15. Operacionalización de variables.....	29
CAPÍTULO IV .....	32
Resultados y discusión .....	33
4.1 Análisis de prevalencia.....	33
4.2. Estandarización de la técnica de PCR convencional .....	34
4.2.1. Elección de cebadores (Primers) .....	34
4.2.2. Reconstitución de Primers.....	35
4.2.3. Preparación de la solución madre (MasterMix) .....	36
4.2.4. Amplificación.....	36
4.2.5. Post-PCR .....	37
4.2.6.Electroforesis.....	37
4.2.7.Revelado.....	38
4.2.8. Análisis de geles.....	38
4.3. Variabilidad genética.....	41
DISCUSIÓN .....	43
CONCLUSIONES .....	46

ANEXOS.....	47
BIBLIOGRAFÍA.....	102

## ÍNDICEDE TABLAS

<b>Tabla No</b>	<b>Descripción</b>	<b>Página</b>
1	Variedad de patotipos de <i>Escherichia coli</i>	2
2	Cuantificación de DNA	23
3	Muestras EPEC por laboratorios	28
4	Tabla de frecuencias subtipos de EPEC	28
5	Primers utilizados – secuencias específicas	29
6	Composición de MasterMix	31
7	Procedimiento para amplificación de primers	31
8	Detalles del procedimiento post-PCR	32
9	Secuencias por muestras analizadas	37



## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración No	Descripción	Página
1	Localización de los antígenos “O”, “K”, “H” de <i>E. coli</i> .	9
2	Mecanismos de acción <i>Escherichia coli</i> entero-toxigénica.	11
3	Carriles con diluciones Control de Calidad	23
4	Diagrama de pastel prevalencias subtipos EPEC	29
5	DOR (%) muestras analizadas	34
6	Resultados Genes <i>eae</i> y <i>bfp</i>	36

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo No.</b>	<b>Descripción</b>	<b>Página</b>
<b>1</b>	Equipos utilizados en esta investigación.	42
<b>2</b>	Materiales utilizados en esta investigación.	43
<b>3</b>	Tabla abstracta de la estandarización de la técnica.	44
<b>4</b>	Tabla de Secuencias de las muestras	

<b>Letra</b>	<b>Número de muestra</b>	<b>Secuencia de Patotipo</b>	<b>Página</b>
a	8	aEPEC	45
b	21	aEPEC	47
c	3	aEPEC	49
d	23	aEPEC	51
e	11	aEPEC	53
f	28	aEPEC	55
g	37	tEPEC	59
h	39	aEPEC	60
i	45	aEPEC	62
j	48	tEPEC	64
k	55	tEPEC	66
l	60	aEPEC	67
m	64	aEPEC	70
n	70	tEPEC	72
o	85	tEPEC	74
p	86	aEPEC	77
q	89	aEPEC	80
r	93	aEPEC	82

<b>5</b>	Procedimiento de extracción y electroforesis	86
<b>6</b>	Gel final luego de estandarización y lectura.	87
<b>7</b>	Protocolo de extracción y cuantificación de ADN	88

<b>8</b>	Tablas de cuantificación de DNA de cada una de las muestras.	90
<b>9</b>	Análisis software Progel	98
<b>10</b>	Aclaratoria	102

## LISTA DE SIGLAS

<b>EPEC</b>	<i>Escherichia coli</i> Enteropatógena
<b>ECEH</b>	<i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica
<b>ECEA</b>	<i>Escherichia coli</i> Enteroagregativa.
<b>ECEI</b>	<i>Escherichia coli</i> Enteroinvasiva.
<b>ECDA</b>	<i>Escherichia coli</i> Difusoadherente
<b>“<i>eae</i>”</b>	attaching and effacing
<b>“<i>bfp</i>”</b>	<i>Bundle-forming pilus</i> (Inglés).
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la Polimeraza
<b>cGMP</b>	Monofosfato de Guanidina cíclico
<b>cAMP</b>	Monofosfato de Adenosin cíclico.
<b><i>pINV</i></b>	plasmid Invasive Virulence (Inglés)
<b><i>Ipa</i></b>	Invasion Plasmid Antigen (Inglés)
<b><i>Hep-2</i></b>	Human epidermal 2 (Inglés)
<b><i>Tir</i></b>	Translocated intimina receptor (Inglés)
<b>TTSS</b>	Sistema de Secreción Tipo III
<b>tEPEC</b>	typical Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i>
<b>aEPEC</b>	atypical Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i>
<b>HeLa/Hep-2</b>	Herriet Lack cell /human epidermal 2
<b>pEAF</b>	plasmid Effacing Adherence Forming
<b><i>Mapk</i></b>	Mitogen-Activated Protein Kinases
<b>PAI</b>	Isla de patogenicidad
<b>LEE</b>	Locus of Enterocyte effacement (Inglés)

## RESUMEN

*Escherichia coli* Enteropatógena (EPEC) es un patógeno estricto del ser humano y de algunas especies animales; este microorganismo es causante de disenterías a nivel mundial y se encuentra en cualquier reservorio, sea este alimento o agua contaminada. Su contagio es fácil y la cantidad de colonias necesarias para infectar al ser humano es mínima, ( $10^7$  Unidades Formadoras de Colonia por mililitro). Este patotipo se divide en dos subtipos con características similares pero genotípicamente la ausencia de un segmento genético completo induce la aparición de un subtipo atípico de mayor resistencia a la terapia general. Al ser una bacteria muy común que afecta principalmente a poblaciones susceptibles como niños menores de 5 años de edad se ha evidenciado que representa la cuarta causa de muerte en el Ecuador según los organismos de control (INEN, 2010). Análisis estadísticos de este patotipo lo categorizan con una prevalencia del 51,4% (Datos no publicado) sin embargo en el país no se han realizado este tipo de estudios estadísticos de los subtipos típico y atípico de ECEP. En la presente investigación, se propuso determinar la prevalencia de este microorganismo por medio de la realización de un estudio del tipo observacional, descriptivo y transversal. Para la determinación de los subtipos de *Escherichia coli* Enteropatógena, se basó en el método de biología molecular denominado Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR convencional), con el cual se logró identificar la presencia o ausencia de los genes “*eae*” y “*bfp*”; y por medio del análisis estadístico se obtuvo el respectivo resultado de prevalencia para la población estudiada.

Por otro lado se probó que el microorganismo ECEP atípica es la más prevalente en la población investigada (89,36%); se consiguió estandarizar la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR convencional); además por medio de un análisis de la densidad óptica relativa de los geles de agarosa después de realizar el revelado, el cual revela un valor numérico del gen amplificado, se estableció la ausencia de diferencias significativas entre las muestras analizadas, y para finalizar las muestras fueron sometidas a un análisis de secuenciación cuyos resultados indican que los segmentos genéticos evaluados no presentan mutación o variabilidad génica.

**Palabras claves:** Prevalencia, PCR, aECEP, tECEP, variabilidad genética, densidad óptica relativa.

## ABSTRACT

Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) is a strict pathogen of human and some animal species; this microorganism is causing of dysentery worldwide and found in many reservoirs, be it food or water contaminated. Therefore, it's contagion and it's easy to ground. The colonies number needed to infect humans is minimal, (107 colony-forming units per milimeter). This pathotype is divided in two subtypes with similar characteristics, but genotypically the absence of complete gene segment induces the appearance of atypical subtype generally more resistant to therapy. Being very common bacteria, affects primarily to susceptible populations such as children under 5 years old; it has also been shown that represents the fourth cause of death in Ecuador according the control agencies. Prevalence studies of this pathotype, categorizes it with 51.4% (unpublished data), however in the country have not done this statistical studies sorts of typical and atypical EPEC subtypes.

In this research, we aimed to determine the prevalence of this microorganism through to observational, descriptive and transversal study. To determine the subtypes of enteropathogenic *Escherichia coli* was based on molecular biology method known Polymerase Chain Reaction (Conventional CRP), which was identified the presence or absence of the "*eae*" and "*bfp*" genes; and by means of statistical analysis the prevalence was obtained. On the other hand we proved that atypical EPEC microorganism is more prevalent in the research population (89.36%); furthermore It was get to standardize the polymerase chain reaction (PCR conventional); moreover the relative optical density (ROD) analysis of agarose gel after performing the disclosed; which shows a numerical value of amplified gene; no significant differences between the analyzed samples was established; and finally the samples were subjected to sequencing study whose results indicate that genetic segments have evaluated no present the mutation or genetic variability.

**Keywords:** Prevalence, PCR, aEPEC, tEPEC, genetic variability, relative optical density.

## **CAPITULO I**

## Introducción

La presente investigación hace referencia a la identificación y caracterización de *Escherichia coli* enteropatógena típica y atípica en individuos con diarrea infantil. Las enfermedades gastrointestinales siempre han sido y serán la causa más común de morbilidad en el ser humano, sin embargo investigaciones de todo tipo han conseguido probar que no solo se dan por parásitos de naturaleza patógena, sino también por algunos hospederos de la microbiota humana. (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2010), (Hernández, Walder, & Vieira, 2009)

En este contexto todos los parásitos comensales del organismo del ser humano pueden llegar a convertirse en patógenos oportunistas en algún momento de su ciclo de vida, en el caso de que ciertos factores que controlan su proliferación cambien y ese equilibrio natural se presente afectado. (Esquivel, Lifschitz, & Medina, 2010)

*Escherichia coli* es uno de los protagonistas de este hecho, siendo muy común en la microbiota humana, sin embargo la misma especie posee varios patotipos peligrosos y algunos incluso mortales sin un tratamiento adecuado. Esta variedad de patotipos atacan con casi exclusividad a uno de los grupos más vulnerables de la vida humana los cuales son los niños menores de 5 años de edad. La infección causada por *Escherichia coli* enteropatógena produce diarrea en los países en vía de desarrollo; los bebés son los más afectados por este patógeno y lo pueden experimentar en repetidas infecciones (Fagundes-Neto U y col 1997; Hill SM y col, 1991). Esto conduce a intervalos prolongados durante el desarrollo de la primera infancia sin el beneficio de micronutrientes; suficiente glucosa y otros factores nutritivos a través del intestino (Fagundes-Neto U y col, 1996).

En la población en general, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo; las enfermedades gastrointestinales son las más frecuentes y en ciertos casos inciden con un elevado porcentaje en las tasas de mortalidad poblacional sobre todo en niños menores a cinco años (Ochoa Woodell, 2008).

Por conocimiento general se sabe que la mayor parte de diarreas en el ser humano pueden ser causadas por protozoarios *Giardia lamblia*, virus como Rotavirus, Adenovirus o bacterias; dentro de los cuales podemos citar: *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Clostridium difficile*, *Campylobacter spp.* (Pritchard & Lewis, 2012); Sin embargo se conoce que en muchos tipos de diarreas son provocadas por *Escherichia coli*, que si bien es una bacteria



comensal; en nuestro organismo también puede ser oportunista y generar cuadros infecciosos debido a inmunosupresiones de diferente índole. Existen patotipos de esta bacteria que son patógenos en su totalidad para el ser humano (Ver Tabla No 1)

**Tabla No 1: Variedad de patotipos de *Escherichia coli***

<i>Sigla</i>	<i>Patogeno</i>
<i>EHEC</i>	<i>Escherichia coli</i> entero-hemorrágica
<i>EPEC</i>	<i>Escherichia coli</i> entero-patógena
<i>EAEC</i>	<i>Escherihcia coli</i> entero-agregativa
<i>EIEC</i>	<i>Escherichia coli</i> entero-invasiva
<i>ECDA</i>	<i>Escherichia coli</i> difuso-adherente
<i>ETEC</i>	<i>Escherichia coli</i> entero-toxigénica

Fuente: (Esquivel , Lifschitz, & Medina, 2010).

Todas estas cepas son cosmopolitas, es decir que se encuentran en cualquier región alrededor del mundo y son causantes primordiales de infecciones de tipo diarreico agudo en infantes. Entre todas las cepas existentes, la más prevalente en la ciudad de Quito es el patotipo enteropatógeno en un porcentaje de 51.4% (Datos no publicados).

*Escherichia coli* enteropatógena a su vez ha evolucionado y ha cambiado su estructura genotípica mutando a dos subtipos; el típico que presenta en su estructura dos genes “*eae*” (del inglés attaching and effacing) y “*bfp*” (del inglés *Bundle-forming pilus*); los mismos que le dan características patógenas a este microorganismo; pero por razones que aún se desconocen en su totalidad el mismo patotipo ha desarrollado un subtipo atípico en su genoma, el cual presenta solo el gen “*eae*”. (Nataro & Karper, 2008)

Se ha evidenciado que el patotipo típico se encuentra en zonas industrializadas generalmente en países desarrollados, mientras que su contraparte es más prevalente en países en vías de desarrollo, con lo cual se generó la hipótesis que el patotipo típico ha mutado debido al producto de la automedicación no controlada de antimicrobianos

(Liebchen, Benz, & Mellmann, 2011). Los patotipos de *Escherichia coli* diarreogénicas son una de las causas importantes de infecciones en niños de estratos socio-económicos bajos y altos en países en vías de desarrollo, dichos patotipos no son rutinariamente diagnosticados y son poco conocidos por el médico tratante (Hall, 2008).

Los estudios de prevalencia de cepas de *Escherichia coli* diarreogénicas son escasos en nuestro medio y los datos de subtipos de *E. coli* Enteropatógena “típico y atípico” son casi inexistentes. Por lo tanto, con la realización de esta investigación, utilizando la técnica de PCR convencional se busca responder la siguiente interrogante:

*¿Cuál es la prevalencia de Escherichia coli enteropatógena típica y atípica en muestras de heces fecales de pacientes menores a 5 años de edad con cuadros de diarrea aguda, en la ciudad de Quito, 2013?*

Por otro lado podemos indicar que los cuadros diarreicos siguen siendo una de las principales causas de muerte a nivel mundial (Organización Mundial de la Salud, 2008). En el Ecuador, según las estadísticas sociales del Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEN, 2010); esta enfermedad es la cuarta causa de mortalidad en niños menores de 5 años, mientras que en países desarrollados ocupa el tercer lugar (Organización Mundial de la Salud, 2008).

Centros de investigación dedicados a estudios microbiológicos, utilizan la serotipificación que resulta ser un método costoso para laboratorios clínicos de rutina, frente a esto se encuentran las técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa, que permite identificar grupos y subgrupos de *Escherichia coli* con la ventaja de aminorar costos y tener una mayor sensibilidad y especificidad para la determinación de estos microorganismos; sin embargo estos métodos no se emplean en la rutina diagnóstica, ya que dichos estudios clínicos de *Escherichia coli* enteropatógena no es considerada importante.

## **1.1 Objetivos**

### **1.1.1. Objetivo General**

Determinar la prevalencia de los subtipos típico y atípico del patotipo Enteropatógeno de *Escherichia coli* diarreogénica mediante la técnica de PCR convencional, los cuales fueron aislados de muestras fecales de pacientes menores a 5 años de edad provenientes de laboratorios públicos y privados de la ciudad de Quito.

### **1.1.2. Objetivos Específicos**

- Estandarizar la técnica de PCR convencional para la detección de genes virulentos de *Escherichia coli* enteropatógena subtipos típico y atípico.
- Identificar la variabilidad genética de los subtipos típico y atípico de *Escherichia coli* enteropatógena de muestras fecales de pacientes menores a 5 años de edad con cuadro diarreico agudo provenientes de laboratorios públicos y privados de la ciudad de Quito.

## **CAPITULO II**

## Marco Teórico

### 2.1 Antecedentes

La diarrea aguda es un desequilibrio en el contenido de agua, volumen o frecuencia de las deposiciones con menos de 14 días de evolución (Hall, 2008); la misma que es una causa importante de morbilidad y mortalidad en pacientes pediátricos debido a la pérdida de electrolitos y deshidratación que produce (Organización Mundial de la Salud, 2008).

En esta afección se ha involucrado como mecanismo de transmisión, la ingesta de alimentos o de agua contaminada, es decir por vía fecal-oral. Además de la transmisión interpersonal. La presentación clínica de la enfermedad contiene diferencias debido al tipo de hospedador y por este motivo cada población puede ser más o menos susceptible a esta patología común (Catalina Pirez, 2010).

Un estudio que abrió el campo en la investigación de esta enfermedad fue el realizado en Somalia en el año 1987 en donde, se recolectaron 1,667 muestras de pacientes menores a 5 años que presentaban cuadros diarreicos agudos, reportando que el 89% de estas disenterías, eran causadas por patotipos de la bacteria Gram-negativa *Escherichia coli* (Nicoletti, Superti, Conti, Calconi, & Zagaglia, 1987), pero se creía que esta bacteria era endémica en dicha población.

Años más tarde en el continente americano se realizó múltiples investigaciones, en donde la prevalencia de *Escherichia coli* de tipo diarreogénico ha sido significativa como se detalla en los estudios realizados en el cono sur, específicamente en la ciudad de Corrientes (Argentina) y revela que el 75% de la población total de niños con cuadros diarreicos agudos presentan los patotipos de *E coli*. (Ezquievel , Lifscitz, & Lösch, 2010). Para el año 2002, en Venezuela; se estimó que se producen 1,32 millones de episodios anuales de diarreas agudas con una mediana de 2,2 episodios por niño y por año (Bern, Martinez, De Zoisa, & Glass, 2002). De la misma manera al realizar otro estudio en el mismo país para la determinación del microorganismo causante de diarreas agudas en niños menores de 5 años, se evidenció que de 200 casos se aislaron 169 cepas patógenas de *Escherichia coli*, lo cual sugiere que este microorganismo es el agente etiológico de los cuadros disentéricos (Hannaoui Rodriguez, 2009).

Si bien es cierto estudios de esta bacteria en el Ecuador son escasos; pocos investigadores han llegado a determinar la prevalencia de patotipos de *Escherichia coli*, como es el caso de la investigación realizada por Trueba y col en el año 2005, cuya investigación fue realizada en la comunidad de Borbón del cantón Eloy Alfaro, en la provincia de Esmeraldas donde evidenciaron que de 100 casos de pacientes con cuadros diarreicos agudos, el 3.2 % de los mismos sería causante del patotipo invasivo; el 1.3 % por *Escherichia coli* enterotoxigénica y se determinó que el 0.9 % era causado por *Escherichia coli* Enteropatógena (Trueba & Vieira, 2005).

En el proyecto titulado “Identificación y caracterización de genes virulentos en *Escherichia coli* diarreicas mediante la técnica de PCR en Tiempo Real en muestras de heces fecales de niños menores a cinco años en Quito-Ecuador en el año 2013” de la Pontifica Universidad Católica; cuyos resultados indicaban que el 51.4 % de las muestras presentaron *Escherichia coli* enteropatógena; el 11.5 % de los aislados pertenecieron al patotipo toxigénico. Además se observó que la *Escherichia coli* enteroinvasiva presentaba un 4,8 %; 3,20 % para el patotipo Agregativo; y en el caso de las *Escherichia coli* enterohemorrágica y *Escherichia coli* Difuso-Adherente mostraban un porcentaje de 3,20% y 0,10% respectivamente (Datos no publicados). En el año 2010 una investigación realizada en Libia, se encontró que el patotipo enteropatógeno fue la causante de la mayor parte de diarreas en niños menores de 5 años de edad sin importar su situación económica o social y fue provocado por el subtipo atípico, el cual es característico de esta bacteria y no presenta el gen “*bfp*”. La no expresión de este gen, confiere mayor resistencia para antibioticoterapia. Además en la misma investigación, se evidenció que del 20.6 % de las cepas de *E. coli* enteropatógena, solo el 3% de 243 muestras fueron típicas, lo que desencadena la hipótesis que la bacteria ha mutado, ya que con la ausencia de un sector conservado para la fijación antibiótica es más difícil su eliminación del organismo (Mohamed & Kamel Mohamed, 2012).

En una revisión investigativa ejecutada en Perú, desde el año 1987 hasta el 2001, se encontró que el 9.9% de los casos fueron provocados por EAEC, el 8.5% por EPEC, el 6.9% por ETEC y 4.8% por DAEC, cuando realizaron la clasificación de *E. coli* subtipo típico y atípico obtuvieron como resultado que el 4% del total de *Escherichia coli* enteropatógena pertenece al subtipo típico (Ochoa, Mercado, & Durand, 2011). En una pesquisa realizada en Brasil por el grupo de Liebench, Benz y Mellman, 2011; trabajaron

con 88 muestras de heces fecales, y demostraron que 59 muestras pertenecieron al género *Escherichia coli*, de las cuales el 78.0% fueron ECEA, el 1.7% pertenecieron a ECET, 3.4% a ECEH, y el restante 10% pertenecieron al patotipo *Escherichia coli* enteropatógena, subtipo atípico.

## **2.2. Introducción**

La diarrea aguda es una enfermedad muy común dentro de los países desarrollados y subdesarrollados. Según la Organización Mundial de la Salud, la disentería se encuentra dentro de las 10 enfermedades mortales a nivel mundial ocupando el tercer lugar en niños menores a los 5 años de edad (Organización Mundial de la Salud, 2008).

Este tipo de afección está relacionado con la ingestión de alimentos o de agua contaminada, así como también la transmisión persona a persona (Nataro & Karper, 2008). Se han determinado muchos agentes etiológicos de diarreas agudas, entre los más comunes podemos citar a bacterias, protozoarios y virus; así como también algunos habitantes que se consideran dentro de la microbiota comensal, que por algún desequilibrio en el sistema inmune se transforman en patógenos para el ser humano, siendo *Escherichia coli* el más común.

## **2.3. *Escherichia Coli***

### **2.3.1. Generalidades**

*Escherichia coli* fue descubierta en 1885 por Theodor Escherich, quien en un principio la denominó *Bacterium coli*, y posteriormente cambio de nombre en honor a su descubridor. Esta bacteria es necesaria para el correcto funcionamiento del sistema gastrointestinal, ya que provee grandes cantidades de vitamina “K” y ayuda a la descomposición de sustancias tóxicas para el organismo.

Este microorganismo es un habitante común del tubo intestinal de los animales y del hombre colonizando desde el primer día de vida y permanece como microbiota de este hábitat por el resto de la misma (López Alvarez, 2010). Mediante investigaciones se conoce que *E. coli* permanece a lo largo de todo el tubo intestinal aumentando su recuento

en la parte proximal y disminuyendo en la parte distal. De la misma manera se sabe que esta bacteria puede dividirse en cepas transitorias y residentes, las primeras ingresan al organismo humano en la alimentación diaria, haciendo a este un medio de paso en su ciclo vital, sin causar ningún tipo de problema y eliminándose inmediatamente. Por otro lado las cepas residentes habitan en el organismo participando de mutualismo con el hospedador y ayudando a este con la absorción vitamínica y el metabolismo diario (Catalina Pirez, 2010).

Es importante destacar que aunque muchas cepas de *E. coli* son parte esencial de la microbiota del ser humano, no es la que predomina ya que bacterias anaerobias facultativas incluyendo *Enterococcus spp* y *Lactobacillus spp*, conforman del 0.1 al 1% de la totalidad bacteriana de este medio. Así pues, el predominio del sistema lo tienen bacterias anaerobias estrictas de los géneros: *Bacteroides*, *Bifidobacterium* y *Clostridium*; sin embargo se conoce que si en el cuerpo del hospedador existe una disminución del sistema inmunológico puede pasar del estado comensal para convertirse en un patógeno oportunista causando diarrea aguda.

### **2.3.2. Serogrupo**

El serotipo o serogrupo se define como la clasificación de un microorganismo según los antígenos que presenten en su superficie y permiten diferenciar a los organismos en niveles de sub-especies. Con el desarrollo de estos métodos se identificó varios serogrupos de *E.coli*, los mismos que se han derivado en base a los antígenos de superficie “O”, “K” y “H” (Trueba & Vieira, 2005). En donde se conoce como antígeno a toda sustancia particular de un posible patógeno y único, que puede causar una respuesta inmune adaptativa.



#### **2.3.2.1. Antígeno “O”**

Estos antígenos se encuentran localizados en la pared bacteriana siendo muy difíciles de distinguir, puesto que su conformación molecular es muy similar a la endotoxina por que la composición de su pared es abundante en lipoproteínas.

Existen 153 diferentes grupos antigénicos que se reconocen a nivel mundial para *E. coli*, los cuales se denominan en numeración ordinal, todos ellos se caracterizan por ser de naturaleza termoestable, resistiendo hasta los 121° C y constituyendo la base de la identificación de dicha bacteria (Ver ilustración N°1) (Catalina Pirez, 2010).

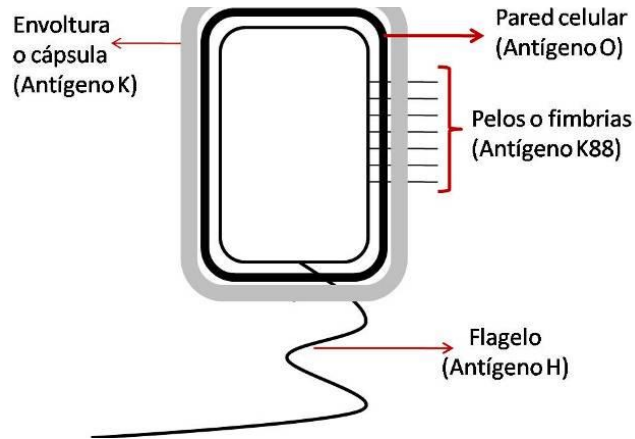
#### **2.3.2.2. Antígeno “K”**

Estas proteínas, se encuentran recubriendo la pared bacteriana, ya sea en forma de una delgada membrana o como cápsula que genera una neutralización del antígeno “O”, por lo cual para la determinación del serogrupo de *E. coli*, debe ser denaturalizado el antígeno “K” mediante calor. Además es importante mencionar que se han descubierto tres sub-serotipos del antígeno “K”, los cuales se denominan “L”, “B” y “A”; y son responsables de características físicas, tales como fimbrias o formaciones proteicas en forma de pelos. (Ochoa, Mercado, & Durand, 2011), (Ver ilustración N°1).

#### **2.3.2.3. Antígeno “H”.**

Este antígeno es poco investigado, aunque existen 51 grupos de antígenos “H”, los cuales han sido numerados de manera ordinal; además se sabe que son termolábiles de naturaleza proteica. Estos antígenos, se encuentran a nivel de flagelos, y es por esto que algunas especies de *E. coli* los poseen y otras no (Ochoa, Mercado, & Durand, 2011)(Ver ilustración N°1).

**Ilustración 1: Localización de los antígenos “O”, “K”, “H” de E.coli.**



Fuente: (López-Álvares, 2010)

Las serotipificaciones de *E. coli* han permitido avanzar en el tema investigativo, ya que es una de las bacterias más estudiadas. Por sus condiciones ambientales y genéticas se han logrado determinar alrededor de 150 diferentes sub-tipos (Ochoa & Contreras, 2011) pero en esta especie existen patotipos, los cuales son 100% patógenos para el ser humano y poseen diferentes mecanismos de patogenia generando distintos cuadros clínicos con diferentes signos y síntomas (López-Álvares, 2010).

### **2.3.3. Patotipos**

El patotipo es una variedad de especie la cual es totalmente patógena para un organismo; mientras que el término “Bacteria Patógena”, se aplica a todas las cepas bacterianas que generen cualquier tipo de patología, por esta razón que los patotipos de *E.coli* que generen enfermedades o cambios en la fisiología del tracto gastrointestinal reciben el nombre de bacterias “enteropatógenas” (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2010).

Por conocimiento general se conoce que todas las patologías que se presentan en el ser humano cumplen con un proceso previo y durante la infección, el mismo que tiene una serie de condicionantes las cuales determinan el poder patogénico y los daños que puede causar el microorganismo. En el caso de los patotipos de *E. coli* todos cumplen con el siguiente proceso:

1.- El ser humano necesita infectarse con una cepa de *E.coli* enteropatógena, estas cepas se encuentran en abundancia en el medio ambiente. Se necesita de una media de  $10 \times 10^7$  UFC/mL de inóculo para causar una probable infección.

2.- *Escherichia coli* debe proliferar en el segmento anterior del yeyuno, pero existen algunos factores que pueden impedir esta acción, entre estos podemos citar:

a) Motilidad intestinal: un cambio en este factor puede generar un medio de cultivo idóneo para la formación de colonias viables para una invasión.

b) Secreciones glandulares: grandes cantidades de este tipo de secreción puede arrastrar a bacterias peligrosas fuera de la luz intestinal.

c) Factores nutricionales: aplicables para el desarrollo óptimo bacteriano.

3.- Producción de enterotoxinas y acción de las mismas sobre los enterocitos.

Si todo este proceso es fisiopatológicamente viable, *E.coli* infecta al hospedador generando enfermedades diferentes según sea el patotipo (Ochoa & Contreras, 2011). Cada uno de los diferentes subtipos patógenos de *Escherichia coli* tiene mecanismos fisiológicos y bio-moleculares de acción como:

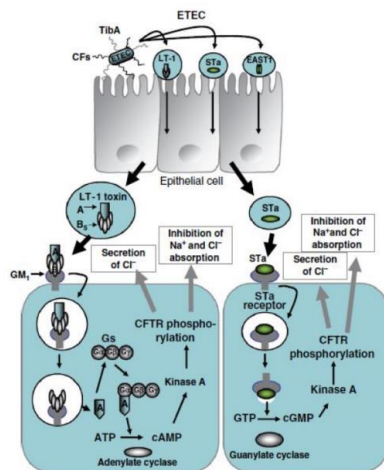
#### **2.3.3.1. *Escherichia coli* entero-toxigénica**

*Escherichia coli* enterotoxigénica está relacionada con un cuadro clínico que presenta diarrea acuosa, dolor abdominal, náuseas y vómito; considerada una de las bacterias de mayor estudio debido a su alto nivel de morbilidad en niños menores a 5 años de edad. La carga bacteriana para que se produzca infección por este patotipo es muy baja conteniendo  $10^7$  UFC/mL, aunque estudios han demostrado que en niños la carga necesaria puede ser mucho menor (Nataro & Karper, 2008).

Los mecanismos generales de acción de este subtipo son sencillos y se basan en dos proteínas de tipo enterotoxigénicas: termoestable (*ST*) y termolábil (*LT*) la primera aumenta el nivel intracelular de monofosfato de guanidina cíclico (*cGMP*) lo que produce un desequilibrio electrolítico en el hospedador. Esta proteína se codifica de un plásmido y posee subtipos de igual importancia el *STI* y *STII*. En su contraparte la enterotoxina termolábil es codificada por segmentos cromosómicos y su función es el aumento del

monofosfato de Adenosina cíclico (cAMP), lo que provoca que los iones cloro sean liberados en grandes cantidades e inhibe la captación de cloruro de sodio, esto lleva a su vez a una diarrea acuosa híper-osmótica (Jhonson & Nolan, 2009). (Ver ilustración No 2).

**Ilustración 2: Mecanismos de acción  
Escherichia coli entero-toxigénica.**



Fuente: (Ezquievel, Lifscitz, & Lösch, 2010)

### 2.3.3.2. *Escherichia coli*-enteroinvasiva

Fue descrita por primera vez en los años 70. Esta bacteria es genética, bioquímica y clínicamente similar a *Shigella spp.* (Lan & Reeves, 2002). Este microorganismo se presenta de manera endémica en países en vías de desarrollo y desarrollados, con una prevalencia del 1% al 5% de episodios diarreicos entre la población (Nicoletti, Superti, Conti, Calconi, & Zagaglia, 1987).

*Escherichia coli* enteroinvasiva lleva su nombre debido a que esta bacteria logra romper las barreras de la membrana del enterocito invadiéndolo, al mismo tiempo esta célula al notar la presencia de un patógeno potencial lo vacuoliza. Sin embargo, un plásmido de 140 MDa denominado *pINV* (del inglés plasmid Invasive Virulence), que codifica la formación de proteínas invasivas del tipo *Ipa* (del inglés Invasion Plasmid Antigen), que le induce habilidad de lisar dicha vacuola para luego inactivar la fosforilación oxidativa la misma que genera la producción de la moneda energética Adenosin Tri-fosfato (ATP), sin energía la célula comienza a perder su función metabólica normal y muere (Neto & Scaletsky, 2004).

La patología causada por esta subespecie es bastante delicada, debido a que un mal diagnóstico y tratamiento puede llegar a generar una perforación de la luz intestinal llegando a producir la muerte del paciente.

#### **2.3.3.3. *Escherichia coli* entero-hemorrágica**

También llamada *Escherichia coli* Shiga-tox, debido a la producción de una toxina “Shiga”, causante del síndrome urémico hemolítico cuyo serotipo más común es el O157:H7, el cual es uno de los patotipos más peligrosos existentes de esta especie, que al poseer grandes cantidades de mecanismos de acción le otorgan un nivel de patogenia bastante elevado (Dubreuil, 2014). La resistencia para antimicrobianos de este patotipo es baja, pero, una mala detección del mismo puede llevar a un cuadro infeccioso prolongado con fallas renales e incluso la muerte (Hannaoui Rodriguez, 2009).

La serie de mecanismos de defensa antes mencionados se dividen en: citotoxinas, plásmidos y factores de adherencia.

Las citotoxinas, son un tipo de proteínas adaptadas para la destrucción celular y en esta estirpe son más conocidas por sus siglas (*Stx*), se dividen a su vez en *StxI* y *StxII*, son producidas por bacteriófagos y esto hace que puedan encontrarse mutaciones provocando al sistema inmune del huésped dificultades para eliminarlas; en cuanto a la estructura son exactamente iguales, pero el mecanismo destructivo es diferente, *StxII* es mucho más tóxica que su homóloga. Por conocimiento investigativo se sabe que la presencia o ausencia de estos mediadores determinan el nivel de patogenia de la bacteria. La acción y/o función de estas citotoxinas es la destrucción parcial o total del tejido epitelial del intestino grueso (Iguchi, Thomson, Ogura, Saunders, & Ooka, 2009).

La presencia de plásmidos en esta bacteria no se encuentra totalmente elucidados, pero se conoce que estos plásmidos dan lugar a la creación de diferentes tipos de factores de virulencia (Dubreuil, 2014). Los factores de adherencia como su nombre lo explica facilitan la adhesión de esta bacteria a la superficie de los enterocitos y permite a su vez resistir los fuertes movimientos peristálticos que produce el intestino.

#### **2.3.3.4. *Escherichia coli* entero-agregativa**

Este patotipo es muy común en países desarrollados causando cuadros diarreicos acuosos, con la presencia o no de moco y sangre con además de dolor continuo a nivel abdominal, náuseas, vómitos y fiebre de 38°C a 39°C.

La capacidad de generar biofilms, que se caracterizan por el acúmulo de EAEC en unión a la fibrina ubicándose en una locación específica. Así mismo es una bacteria de amplia resistencia hacia antimicrobianos y esto se prueba ya que en cultivos *in-vitro* generan gruesas capas que no permiten la correcta difusión de los discos en el medio (Bern, Martinez, De Zoisa, & Glass, 2002).

#### **2.3.3.5. *Escherichia coli* difuso-adherente**

Es uno de los patotipos menos conocidos de esta especie y cuyo mecanismo de acción es casi ignorado; se integra dentro de un grupo de virulencia variable y fue descubierta por las adhesiones que ésta tenía a las células *Hep-2* (del inglés Human epidermal 2) en ensayos *in-vitro*.

Se conoce su poder de formar micro colonias al adherirse a células entéricas mediante fimbrias, lo cual le otorga una adherencia difusa, como lo hace también EAEC. Las infecciones por este subtipo suelen ser auto limitadas y casi exclusivas en niños menores a un año de edad que se encuentren con una inmunodepresión severa y genera un tipo de diarrea aguda que aparece y desaparece espontáneamente sin ser tratada mediante antimicrobianos (Nataro & Karper, 2008).

#### **2.4. *Escherichia coli* entero-patógena**

EPEC es uno de los patotipos más comunes, causando más del 40% de las enfermedades de tipo diarreico agudo (Rodríguez, 2008). Fue descrita en el año 1990 tras una epidemia que azotó Somalia y tras esto se inició la investigación de patotipos de *E.coli* bajo técnicas serológicas. Afecta de manera primaria a infantes menores a 2 años de edad, los cuales pueden padecer de una disentería grave e incluso la muerte, por la deshidratación que produce (Catalina Pirez, 2010).

### 2.4.1. Mecanismo patogénico

EPEC es el patotipo más común en enfermedades de tipo diarreicas y posee muchos mecanismos de acción los cuales son básicos y muy potentes; se podría resumir que la adherencia al epitelio intestinal y su capacidad de anular las bombas de sodio y potasio, las mismas que controlan la entrada y salida de electrolitos y por ende la viabilidad del enterocito vuelven de ella un patotipo peligroso para todas las edades. Ya que esta bacteria no ingresa al enterocito para destruirla se la considera una bacteria “no invasiva” (Jhonson & Nolan, 2009).

La adherencia de EPEC a las células del epitelio intestinal es conocida como “adherencia y esfacelamiento” la cual está dada por pilis o fimbrias decodificadas por un gen denominado “*bfp*” que se codifica de un plásmido denominado “*eae*”, las mismas que conlleva a la formación de estructuras ricas en filamentos de actina denominadas “pedestales”. El proceso requiere la translocación del efector bacteriano *Tir* (del inglés translocated intimina receptor) en el citoplasma de la célula hospedadora a través del sistema de secreción tipo III (TTSS) (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2010).

La infección por EPEC provoca el reclutamiento de diversas proteínas de la célula eucariota, muchas de ellas implicadas en la destrucción del cito-esqueleto de actina (López-Álvarez, 2010). Cuando se da una denaturalización de las proteínas del cito-esqueleto, el enterocito pierde su consistencia y su capacidad de absorción. Si cada unidad formadora de colonias invade un enterocito causando el mismo daño y dando como resultado un aumento de los movimientos peristálticos lo que produce una diarrea aguda (López Alvarez, 2010).

### 2.4.2. Filogenia de los subtipos típicos y atípicos:

Un estudio realizado por la federación Europea de Microbiología, mediante micro-arreglos indica que: “los dos subtipos de *E. coli* tienen sectores genéticos conservados pero la estructura de los mecanismos de virulencia es diferente”. Con lo que se concluye que el subtipo atípico evolucionó por cambios en el medio externo (Afset, Bergh, & Bevanger, 2004).

Otra afirmación interesante sobre la evolución de esta subespecie se da al analizar los datos de prevalencia de estos subtipos. En países desarrollados la tEPEC (Típica

*Escherichia coli* Enteropatógena) es la bacteria que comanda las bases de datos; mientras que en países subdesarrollados y en vías de desarrollo se invierte la cuenta y aEPEC (Atípica *Escherichia coli* Enteropatógena) es la más prevalente. Lo que hace pensar que la facilidad de recurrir a la auto-medicación en estos países dio el inicio de la evolución a estructuras más simples y con muchos más mecanismos de virulencia específica, como se explicará a lo largo de este documento. (Iguchi, Thomson, Ogura, Saunders, & Ooka, 2009).

## **2.5. *Escherichia coli* enteropatógena subtipo típico**

### **2.5.1. Virulencia específica**

Para generar un cuadro disentérico, EPEC subtipo típico se adhiere al componente extracelular de los enterocitos conocido como HeLa/Hep-2 (del inglés Herriet Lack cell / Human Epidermal 2) en ensayos in vitro, generando pedestales bacterianos que colonizan a estas células. Esto se logró gracias a que en su estructura genética tEPEC posee un plásmido con factores de adherencia (pEAF) (del inglés Effacing Adherence Forming plasmid) (Afset, Bergh, & Bevanger, 2004). Estas lesiones se caracterizan además por la acción de una secuencia muy marcada de proteínas:

- 1) Un patrón de F-actina; es decir microfilamentos de actina los cuales son esenciales para el movimiento celular se pone en contacto con el cito-esqueleto bacteriano formando enlaces rígidos que generan las bases para la construcción de pedestales.

- 2) Por la proteína *Tir*, la cual cambia la posición y la configuración espacial del receptor de intima e inhabilita el TTSS de los enterocitos, generando una cascada de señales para que más bacterias interactúen con las células diana que se encuentran en las cercanías.

- 3) Otras dos proteínas entran en acción, el *Mapk* (Mitogen-Activated Protein Kinases), estas junto al *Tir* se encargan de destruir la proteína intimina que se encuentra en los enterocitos, lo que hace que se dé una separación entre ellos generando un desequilibrio en el epitelio intestinal (Afset, Bergh, & Bevanger, 2003). Al mismo tiempo se activa la proteína “*bfp*” que codifica para la creación de



pilis. En este caso particular no tienen una funcionalidad sexual sino aumentan la adherencia bacteriana junto a la proteína adherina codificada por el gen “*eae*” (Afset, Bergh, & Bevanger, 2003). Por último esta bacteria inactiva el co-transportador de glucosa y sodio llevando a la bacteria a un estado total de colapso y liberando en grandes cantidades electrolitos a la luz intestinal.

## **2.6. *Escherichia coli* enteropatógena subtipo atípico**

Este subtipo es el más común dentro de los datos de prevalencia hasta ahora investigados en países tanto desarrollados como en vías de desarrollo, se caracteriza por poseer el gen “*eae*”, el mismo que codifica a muchos factores virulentos entre estos al mecanismo de “adherencia y esfacelamiento”

### **2.6.1. Virulencia específica**

Los mecanismos de patogenicidad de aEPEC son muy similares a los del subtipo típico, sin embargo poseen algunas variantes que hacen de estos más competitivos a pesar de la gran simpleza génica de esta bacteria.

Genéticamente este subtipo posee en su estructura cromosómica diferente un sector en donde se reúnen todas las combinaciones necesarias para la creación de los diferentes mecanismos de patogenia, es por esto que, se ha denominado a éste como isla de patogenicidad (PAI) y es una compleja estructura genética en donde se da el antagonista de todo un sistema celular de defensa denominado LEE (del inglés Locus of Enterocyte effacement) es decir, que la bacteria reproduce desde transportadores, receptores e incluso un anti-TTSS para hacer daño directo al enterocito.

El mecanismo característico de aEPEC es el de “adherencia y esfacelamiento”, en sí es el mismo que le permite adherirse a los enterocitos; la diferencia entre los dos subtipos es que la atípica al interactuar con la membrana celular del enterocito genera una gran cantidad de actina polimerizada la cual cumple dos funciones: la primera, sirve de mediador químico para atraer más unidades bacterianas; mientras que otra de las funciones es la de adherencia de unas con otras generando los denominados “Pedestales Bacterianos” clásicos en las infecciones por aEPEC (Hernandez, Elias, & Vieira, 2009). Tras dar este paso, la bacteria ingresa una secuencia genómica al citosol del enterocito por medio de una

estructura denominada “Tir”, la cual actúa como un puente de intercambio entre el citoesqueleto bacteriano y la membrana celular del enterocito (López-Álvarez, 2010). Al insertarse esta secuencia induce un cambio en el funcionamiento de la célula intestinal y comienza por invertir la osmolaridad del medio interno del enterocito produciendo el ingreso de grandes cantidades de agua y pérdida de electrolitos hacia la luz intestinal generando que el paciente caiga en una deshidratación severa en pocas horas (Afset, Bergh, & Bevanger, 2004).

El gen “*eae*”, en el subtipo atípico codifica para otra proteína denominada intimina ya que induce más profundamente el proceso de adherencia bacteriana. Posee cuatro variantes de la misma proteína (*alfa*, *beta*, *gamma* y *epsilon*), con lo que se logra una mayor complejidad para la detección del sistema inmune del hospedador. Investigaciones revelan que cada variante de esta proteína se encuentra a nivel de cada país o región, así por ejemplo en Brasil la aEPEC serotipo O51-H40, posee la variante *gamma*; mientras que en España el mismo serotipo bacteriano posee la variante *epsilon* (Mellies, Barron, & Carmona, 2007).

### **CAPITULO III**

## **Marco Metodológico**

### **3.1. Tipo de estudio**

El presente estudio es de tipo observacional, descriptivo y transversal. Debido a que el investigador no controla las variables, y estas reflejan una evolución natural de los eventos (Observacional); descriptivo ya que las variables a estudiar son de tipo cualitativas por presencia o ausencia de un gen y transversal porque solo se realizó una medición de las variables sin seguir una evolución de la mismas.

### **3.2. Población - Ambiente – Período**

Se realizó el estudio en las cepas bacterianas, confirmadas como *Escherichia coli* enteropatógena obtenidas de muestras recolectadas en 4 laboratorios públicos y privados de la ciudad de Quito, los cuales se utilizaron en el proyecto de la Escuela de Bioanálisis, denominado: “Identificación y caracterización de genes virulentos de *Escherichia coli* diarreicas mediante la técnica de PCR en Tiempo Real, en muestras de heces fecales en niños menores de 5 años, Quito-Ecuador”.

### **3.3. Prevalencia, estandarización y secuenciación.**

La prevalencia en este estudio fue definida como la proporción de *Escherichia coli* enteropatógena subtipos típico y atípico en un periodo de tiempo determinado; es necesario indicar que la presente investigación es un estudio de prevalencia puntual, debido a que la misma se la realizó en un tiempo definido ya que la recolección de muestras se la obtuvo en los meses de febrero a marzo del año 2013.

La estandarización esta definida como el conjunto de procesos y procedimientos para asegurar la reproducibilidad y repetitibilidad de los resultados obtenidos en la PCR, mientras que la secuenciación es una sucesión de nucleótidos representando la estructura primaria de una molécula real o hipotética de ADN, con la capacidad de transportar información.

### 3.4 Criterios de inclusión

Los criterios de inclusión para las muestras fueron todas aquellas cepas bacterianas obtenidas del proyecto mencionado con antelación, las cuales luego de ser procesadas mediante la técnica molecular de PCR en Tiempo Real, presentaron solamente la amplificación del gen “*eae*”.

### 3.5. Criterios de exclusión

Toda cepa bacteriana obtenida del mismo proyecto indicado previamente, y que luego de ser analizada mediante la técnica de biología molecular PCR-Tiempo Real genere amplificación en los genes: *ipah*, *st*, *lt*, , *stx-1*, *vt1* y *vt2*.

### 3.6. Metodología

La presente investigación se realizó en tres etapas que se detallan a continuación:

- En la primera fase del proyecto se clasificaron de las muestras que cumplían los criterios de inclusión, las mismas que se obtuvieron del proyecto mencionado.
- La segunda parte del estudio se enfocó en realizar la estandarización y procesamiento de las muestras mediante la técnica de PCR convencional, con los primers específicos para los genes: “*eae*” y “*bfp*”, además en esta etapa se ejecutó el estudio de secuenciación de las muestras analizadas.
- En la etapa final se analizaron los resultados obtenidos y la escritura de la disertación de tesis que generó la presente investigación.

### 3.7. Tamaño muestral.

El tamaño de la muestra fue de 94 especímenes, los cuales fueron definidos a partir del total de muestras obtenidas en el proyecto de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Escuela de Bioanálisis con el título: “Identificación y caracterización de genes

virulentos de *Escherichia coli* diarreicas mediante la técnica de PCR en Tiempo Real en muestras de heces fecales en niños menores de 5 años, Quito-Ecuador”.

### **3.8. Análisis de Densidad Óptica Relativa (DOR)**

La densidad óptica relativa se define como el nivel de absorbancia que presenta una luminosidad; y este término al aplicarlo a métodos moleculares nos da la referencia de un valor numérico del gen que fue amplificado con la técnica de PCR. Para realizar el cálculo de la DOR se utilizó un Software denominado “Gelpro” (Media Cybernetics Inc),(Avilés-Reyes RX y col 2011, 2014).

Los experimentos y mediciones se realizaron tres veces y muestran resultados idénticos. Las comparaciones estadísticas se analizaron con “ANOVA” y Student-Newman-Keuls post-test utilizando Graph Pad Software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EE.UU).

### **3.9. Materiales**

En el presente estudio se utilizó materiales y equipos que pertenecen a la Escuela de Bioanálisis de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, los mismos que se describen en los Anexos 1 y 2.

El desarrollo de la investigación se basó en protocolos definidos para análisis moleculares de cepas bacterianas; y de publicaciones científicas como de los siguientes autores (Ezquível , Lifscitz, & Lösch, 2010), (Trueba & Vieira, 2005), (Avilés Reyes, Aguas, Cardenas, Murillo, & Pablo, 2014), (Avilés Reyes, Angelo, Villareal, & Rios, 2010).

### **3.10 Recolección de muestras**

Las muestras que se utilizaron para esta investigación fueron seleccionadas con los criterios de inclusión determinados, las mismas que se encontraban a una temperatura de menos 80°C en donde las diferentes cepas a estudiar se almacenaban en viales con leche

descremada, con el propósito de que dichas cepas se mantengan en correcta vialidad; es decir sin perder su estructura genética total. Además este compuesto evita una proliferación bacteriana que pueda cambiar las condiciones del medio y por tanto reducir los nutrientes del mismo.

### **3.11. Reconstitución bacteriana**

Luego de la selección y recolección de muestras, las mismas que fueron alicuotadas y congeladas para su conservación; cada alícuota a utilizarse fue descongelada y sembrada tanto en cajas tri-petri con agar MacConkey el cual está compuesto por agar base e inhibidores de crecimiento de cocos, bacilos gram positivos y hongos además de marcadores de pH que cambian de color en caso de fermentar lactosa. También las muestras fueron sembradas en cajas tri-petri con agar nutritivo ya que al no poseer inhibidores de crecimiento o colorantes a base de cambio de pH no interfiere en la extracción de ADN y por ende en los resultados de concentración y calidad del mismo.

Las alícuotas se siembra en los medios mencionados con anterioridad, ya que el agar selectivo MacConkey ayuda a denotar que la cepa lactosa negativa sea pura y que no exista más contaminación; pero dos componentes del mismo: Rojo Neutro y Cristal Violeta, interfieren con la medición y purificación de ADN, es por esta situación que la misma cepa se siembra en agar nutritivo ya que no contiene sustancia que interfieran con el proceso de extracción (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2010).

### **3.12. Extracción y purificación de ADN**

Para esta parte de la investigación se utilizó un kit específico para extracción de ADN de cepas bacterianas, el mismo que fue protocolizado de la siguiente manera:

Se añadió 1ml de la cepa bacteriana en estudio, el cual debía encontrarse en agar nutritivo y no tener más de 24 horas de incubación para que mantenga sus propiedades. Se colocó en un Eppendoff de 1mL 900 microlitros de agua grado molecular y 100 microlitros de la bacteria, (una medición de asa es decir aproximadamente 10 microlitros de cada una

de las cepas). Para asegurar una mezcla homogénea cada una de las preparaciones fue pipeteada y devuelta al envase. Seguidamente se realizó la extracción y purificación del ADN, siguiendo las recomendaciones del fabricante del Kit (Ver anexo N° 8).

### **3.13. Cuantificación de pureza del ADN bacteriano**

Luego de la extracción del ADN, se cuantificó con facilidad y de esta manera garantizamos la calidad y cantidad para poder de realizar la técnica de PCR convencional, por lo tanto se consideró a este un paso indispensable para conocer la cantidad de material genético que se tiene y poder predecir el estado de los amplicones a obtener.

Para esto se utilizó como equipo primario un espectrofotómetro de alta sensibilidad denominado NanoDrop, el cual mide con espectro de 260nm y nos da la cantidad de ADN que poseemos así como también la calidad del mismo en relación a las proteínas que posee la muestra (Ver Anexo N° 6).

### **3.14. Control de calidad**

En concepto control de calidad son todos los mecanismos, acciones y herramientas realizadas para detectar la presencia de errores. En la presente investigación, los controles de calidad fueron positivos y negativos para los subtipos de EPEC; además se estableció un límite de detección de la prueba para determinar cuál es la concentración mínima requerida con lo cual se realizó un análisis correcto y una observación de bandas óptimas.

Todos los controles se realizaron desde el inicio del diseño experimental para esta investigación, iniciando en el repique de la colonia; proceso de extracción y aislamiento de ADN; ejecución de la técnica de PCR y finalizando con el proceso de post-PCR, garantizando la fidelidad de los datos.

#### **3.14.1. Límite de detección.**

Partiendo en un principio, límite de detección es la cantidad o concentración mínima de sustancia; en este caso concentración de ADN bacteriano que puede ser detectada con fiabilidad por un método analítico determinado (Pritchard & Lewis, 2012).



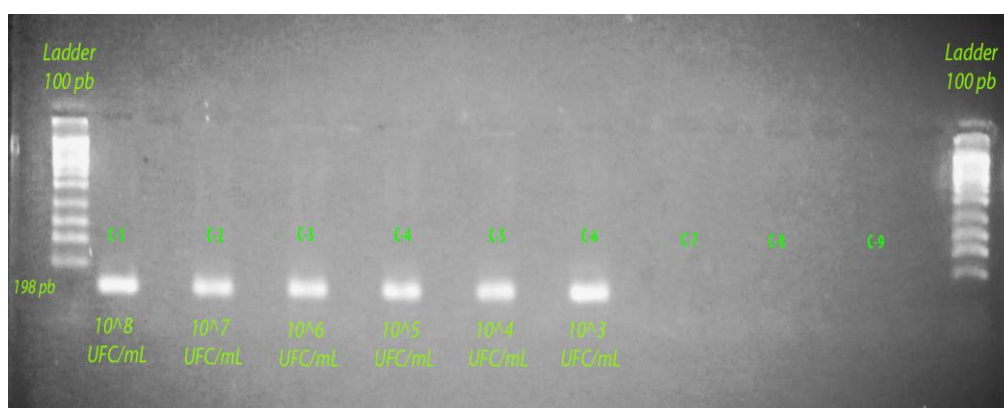
Para su determinación se utilizó una dilución a partir de la colonia control, conociendo mediante la escala Mac. Farland, la cual se basa en una dilución 1/1 con cloruro de Bario y ácido sulfúrico que genera una densidad determinada que al medirse con un espectrofotómetro es proporcional a las suspensiones bacterianas a investigar. Así pues, evidenciamos la cantidad de unidades formadoras de colonias que existían en la suspensión. De esta manera se inició con una concentración de  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL que equivale a un estándar MacFarland de 0.5 en dicha escala, para luego realizar diluciones base 10 con un volumen final de 1000 microlitros. Luego cada una de estas diluciones fue analizada en el Nanodrop, para así cuantificar la cantidad de ADN existente y se procedió a realizarla técnica de PCR para determinar la mínima cantidad detectable en geles, (Ver Tabla N°2 e Ilustración N°3).

**Tabla 2: Cuantificación de DNA**

<i>Dilución</i>	<i>Concentración DNA</i>	<i>Unidad</i>	<i>260/280</i>	<i>260/230</i>
$1.5 \times 10^8$	131.2	ng/ul	1.83	1.60
$1.5 \times 10^7$	115.7	ng/ul	1.76	1.67
$1.5 \times 10^6$	97.5	ng/ul	1.83	1.34
$1.5 \times 10^5$	81.0	ng/ul	1.87	1.54
$1.5 \times 10^4$	64.5	ng/ul	1.76	1.19
$1.5 \times 10^3$	47.4	ng/ul	1.54	1.12
$1.5 \times 10^2$	30.8	ng/ul	1.87	1.58
$1.5 \times 10^1$	13.1	ng/ul	1.87	1.54
1.5	3.6	ng/ul	1.83	1.39

Fuente: Datos obtenidos del análisis cuantitativo de las muestras de ADN de la presente investigación.

**Ilustración 3: Control de Calidad; dilusiones**



Cabe indicar que en los carriles del 1 – 6 se observa claramente la presencia del gen con las diluciones respectivas, mientras que en los carriles 7 al 9 no se obtuvo una amplificación del gen y por lo tanto se establece que la mínima concentración de ADN bacteriano fue de 47.4 ng/uL, es decir una concentración bacteriana aproximada de  $1.5 \times 10^3$  UFC/mL, lo cual nos representó un resultado óptimo para continuar con el estudio.

### 3.15. Operacionalización de Variables

Hipótesis	Objetivos	Variables	Tipo de Variables	Definición Operacional	Categoría	Indicador	Metodología, Técnica o Instrumento
<b>En el Ecuador existe una prevalencia mayor de <i>Escherichia coli</i> Enteropatógena subtipo atípico que el subtipo típico</b>	Determinar la prevalencia de los subtipos típico y atípico del patotipo Enteropatógeno de <i>Escherichia coli</i> diarreogénica mediante PCR convencional, aislados de muestras fecales de pacientes menores a 5 años de edad, provenientes de laboratorios públicos y privados de la ciudad de Quito.	Prevalencia	Cuantitativa	Proporción de muestras que presentan un subtipo de <i>E.coli</i> ECEP desde el 1 de enero hasta el 29 de julio del 2013	—	Número total de subtipos encontrados dividido para la totalidad de muestras de <i>Escherichia coli</i> Enteropatógena obtenidas multiplicado por 100 )	Gráficos estadísticos de pastel y barras
		Subtipos de <i>Escherichia coli</i> Enteropatógena	Cuantitativa	Variante genética del patotipo <i>Escherichia coli</i> Enteropatógena	Típica	Presencia de los genes <i>bfp</i> y “ <i>eae</i> ”	PCR Convencional
					Atípica	Presencia del gen “ <i>eae</i> ”	PCR Convencional
	Estandarizar la identificación de la técnica de PCR convencional para la	Tiempo	Cuantitativa	Minutos de duración de una corrida electroforética	—	Minutos	Cámara de electroforesis
		Amperaje	Cuantitativa	Flujo de	—	Miliamperios	Cámara de

	detección de genes virulentos de <i>Escherichia coli</i> Enteropatógena subtipos típico y atípico			corriente necesario para una corrida electroforética			electroforesis
		Voltaje	Cuantitativa	Diferencia de potencial necesario para una corrida electroforética	—	Voltios	Cámara de electroforesis
		Temperatura	Cuantitativa	Magnitud escalar de energía interna de un sistema termodinámico	—	Grados Centígrados	Termociclador
		Número de Ciclos	Cuantitativa	Cantidad de repeticiones en las condiciones del termociclado	—	Cantidad Nominal	Termociclador
	Identificar la variabilidad genética de los subtipos típico y atípico de <i>Escherichia coli</i> Enteropatógena de muestras fecales de pacientes menores a 5 años de edad con cuadro diarreico agudo provenientes	Variabilidad Genética	Cualitativa	Variación en el material genético de una especie en particular	Típica	Secuencia de DNA	Secuenciador de DNA
					Atípica	Secuencia de DNA	Secuenciador de DNA

	de laboratorios públicos y privados de la ciudad de Quito.						
--	---	--	--	--	--	--	--

## **CAPÍTULO IV**

## Resultados y Discusión

### 4.1 Análisis de prevalencia

Al realizar el análisis de prevalencia; se puede indicar que del total de muestras procesadas en este estudio fue de 96 especímenes previamente identificadas como *Escherichia coli* enteropatógena, las mismas que provienen de diferentes laboratorios, (Ver tabla No 3). Al estudiar las frecuencias de los datos obtenidos con el propósito de realizar la determinación de prevalencia; podemos mencionar que de las 96 muestras investigadas, se obtuvo como resultado una prevalencia de 89.50% de *Escherichia coli* enteropógena subtipo atípico y 10.50% del subtipo típico. (Ver tabla N°4 e ilustración N°7).

Tabla 4: Muestras EPEC por laboratorios

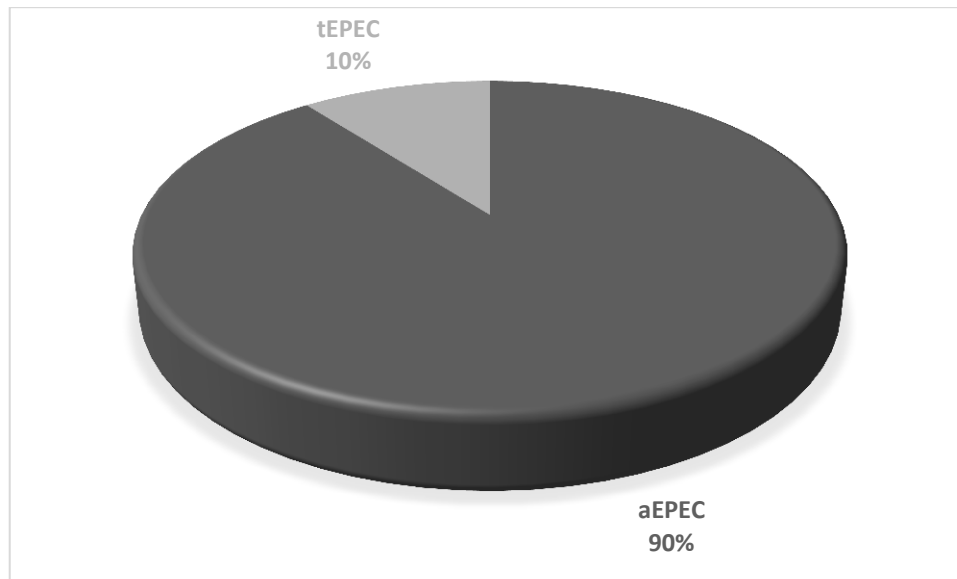
Muestreo EPEC Final		
Laboratorio	Cepas	N°
1	EPEC	35
2		42
3		10
4		7
	Total	94

Tabla 4: Tabla de frecuencias subtipos de EPEC

Categoría	N°	Frecuencia. Absoluta	FrecuenciaRelativa (%)
aEPEC	84	0,893	89,36%
tEPEC	10	0,106	10,64%
TOTAL	96	1	100%

Fuente: Muestras obtenidas de los laboratorios participantes y datos obtenidos del análisis de frecuencias de los subtipos de EPEC de la presente investigación.

**Ilustración 7: Prevalencia de los subtipos atípico y típico de Escherichia coli enteropatógena (EPEC)**



## 4.2. Estandarización de la técnica de PCR convencional

### 4.2.1. Elección de cebadores (Primers)

Cada uno de los primers utilizados en este estudio fue seleccionado tras un estudio de más de 20 investigaciones previas y comparando cada una de las secuencias elegidas por mencionados estudios, de tal manera que los primers utilizados contemplaban la siguiente secuencia de aminoácidos (Ver tabla N°5):

**Tabla 5: Primers utilizados – secuencias específicas**

Gen		Sentido	Tamaño amplicon
“ <i>bfp</i> ”	F	5'- AAT GGT GCT TGC GCT TGC TGC -3'	255.3
	R	5'- GCC GCT TTA TCC AAC CTG GTA -3'	
“ <i>eae</i> ”	F	5'- GTA AGT CTC AAA CGC AAG CAA CCA C -3'	198.5
	R	5' AAC CTT GTT GTC AAT TTT CAG TTC ATC A -3'	



#### 4.2.2. Reconstitución de Primers

El primer forward tiene de peso molecular 255.3 nano moles (nmol) razón por la cual se debió pipetear 41,3µl y así obtener una concentración de 100 uM. Esta concentración sirvió para obtener una solución madre. Se utilizó la siguiente fórmula obtenida de los insertos de reconstitución otorgados por el proveedor.

$$41,3 \text{ nmoles} \times 1000 \text{ pmoles} \times 1 \text{ ul} = 41300 \text{ul} \quad 1 \text{ nmol} \quad 100 \text{ pmol}$$

El primer reverse tiene un peso molecular de 35,3 nmoles razón por la cual se debió pipetear 353 µl para obtener una concentración madre de 100uM con un volumen de 353 ul.

$$35,3 \text{ nmoles} \times 1000 \text{ pmoles} \times 1 \text{ ul} = 353 \text{ul} \quad 1 \text{ nmol} \quad 100 \text{ pmol}$$

Al preparar la solución de primers de trabajó con una concentración de 10uM, para esto pipeteamos en un tubo eppendorf pequeño 10 ul de la solución madre de concentración 100uM, y agregamos 90ul de agua ultrapura, y repetimos este procedimiento con cada uno de los primers. Por otro lado la fórmula pararealizar la solución de trabajo con una consentración de 10µM fue:

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

$$100 \text{ uM} \times V1 = 10 \text{ uM} \times 100 \text{ul}$$

$$V1 = 10 \text{ uM} \times 100 \text{ ul} \quad 100 \text{ uM}$$

$$V1 = 10 \text{ uL}$$

Seguidamente colocamos 10 ul de la solución madre y se aforó a 100 ul para así obtener una concentración de 10uM, con la que se trabajó posteriormente.

#### 4.2.3. Preparación de la solución madre (MasterMix)

Para obtener la solución madre, utilizamos el siguiente protocolo para la determinación de los subtipos de *Escherichia coli* enteropatógena (Ver tabla N°6):

**Tabla 6: Composición de MasterMix**

Master mix	Cantidad para una reacción
Agua Molecular Tipo I	8.5 Microlitros
Primer “ <i>eae</i> ” Forward	0.75 Microlitros
Primer “ <i>eae</i> ” Reverse	0.75 Microlitros
Primer “ <i>bfp</i> ” Forward	0.75 Microlitros
Primer “ <i>bfp</i> ” Reverse	0.75 Microlitros
Go Taq Polimerasa	12.5 Microlitros
ADN EPEC	1 Microlitro
<b>Volumen Final</b>	25 Microlitos

#### 4.2.4. Amplificación

Para realizar este proceso se utilizó como equipo primario un Termociclador marca Labnet, el mismo que fue programado con parámetros puntuales con el objetivo de poder trabajar con cebadores específicos, los cuales fueron determinados para la ejecución de la investigación (Ver tabla No 7).

**Tabla 7: Protocolo para amplificar primers**

Proceso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Denaturación inicial	94°C	5'	1
Denaturación de primers	94°C	0:45''	30
Alineamiento de primers	57°C	0.45''	
Elongación de primers	72°C	0.45''	
Elongación Final	74°C	10'	1
Conservación	4°C	Infinito	Infinito

#### **4.2.5. Post-PCR**

Al utilizarse en esta investigación la Reacción en cadena de la Polimerasa tipo convencional es necesario realizar la técnica de electroforesis en geles de agarosa, la cual aprovecha las cargas eléctricas de las moléculas y las moviliza a lo largo de un campo eléctrico sobre una matriz porosa que presenta un porcentaje específico.

#### **4.2.6. Electroforesis**

Para realizar esta técnica se necesitó preparar un gel revelador, el mismo que se constituyó de agarosa al 0.5%, ya que con este porcentaje facilita la migración de genes de cierta cantidad de pares de bases y/o peso molecular de cada uno de los amplicones antes detallados con lo cual obtuvimos un resultado óptimo de la corrida electroforética.

Tras diluirse con ayuda de calor del microondas todas las partículas de agarosa, se añaden 3 µl de SYBRGreen, el mismo que actúa como quelante, ingresando en los espacios entre las bases del ADN y de esta manera se vuelve visible bajo luz ultra violeta; este gel se lo dejó enfriar por 20 minutos, cubierto con papel aluminio para conservar las propiedades del colorante, ya que pueden ser afectados por la luz convencional.

El gel elaborado se lo coloca en una cámara de electroforesis para ser cargado con una mezcla entre la muestra y una sustancia denominada Blue/Orange, la misma que posee una gran densidad y permite que el ADN descienda en su totalidad dentro de los pocillos del gel y de esta manera tendrá una corrida específica y funcional en proporción al porcentaje de agarosa contenida en el gel.

Todas las cantidades exactas de la estandarización de esta técnica se detallan en la siguiente tabla.

**Tabla 8: Detalles del procedimiento post-PCR**

Detalle	Valores
Concentración de agarosa	0.5%
Cantidad de agarosa	1.5 mg
Cantidad de agua	100 ml
Tiempo de dilución	0:1':35''
Cantidad de SYBR Green	3µl
Tiempo de espera de enfriamiento	25 minutos
Dilución DNA/Blue	Muestra: 0.5µl, Reactivo: 0.5µl Dilución: 1/1.
Cantidad de muestra a cargar	5µl
Tiempo de Electroforesis	60 minutos
Voltaje de Electroforesis	90 voltios
Miliamperaje de electroforesis	120 miliamperios

#### **4.2.7. Revelado**

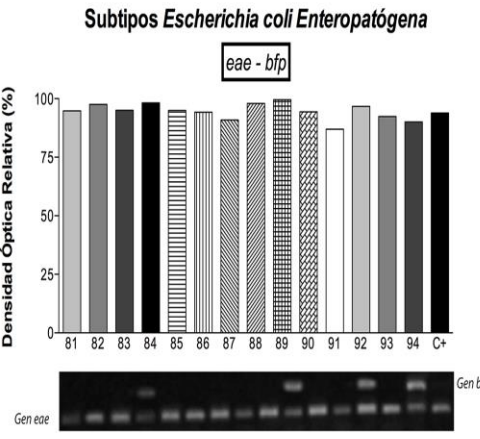
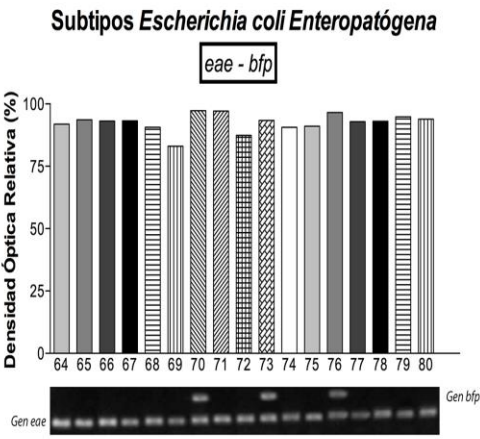
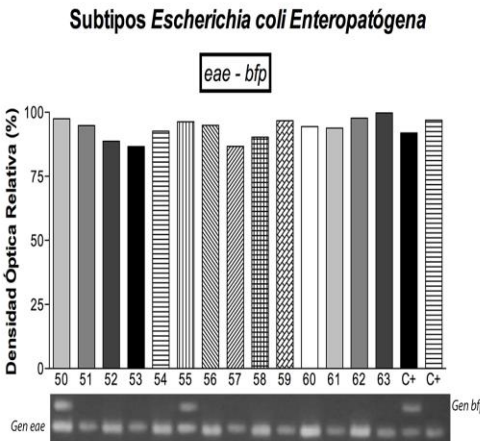
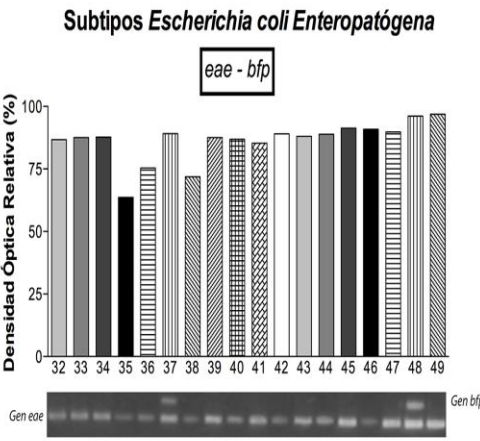
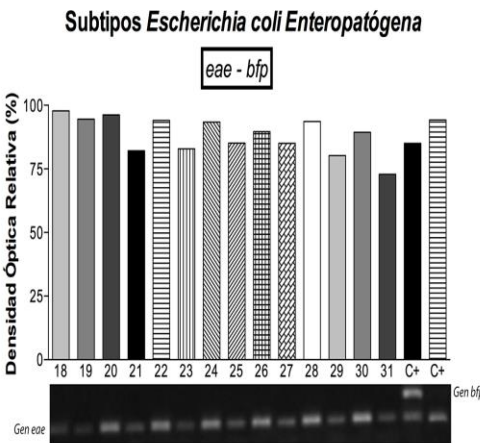
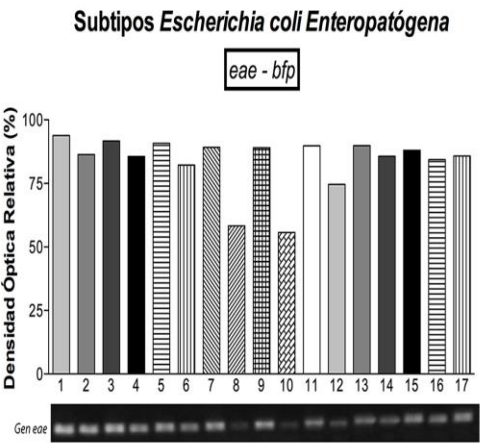
Una vez que se ha terminado la corrida electroforética, el gel es revelado en una cámara de luz ultravioleta, fotografiado y almacenado para su posterior análisis.

#### **4.2.8. Análisis de la densidad óptica relativa**

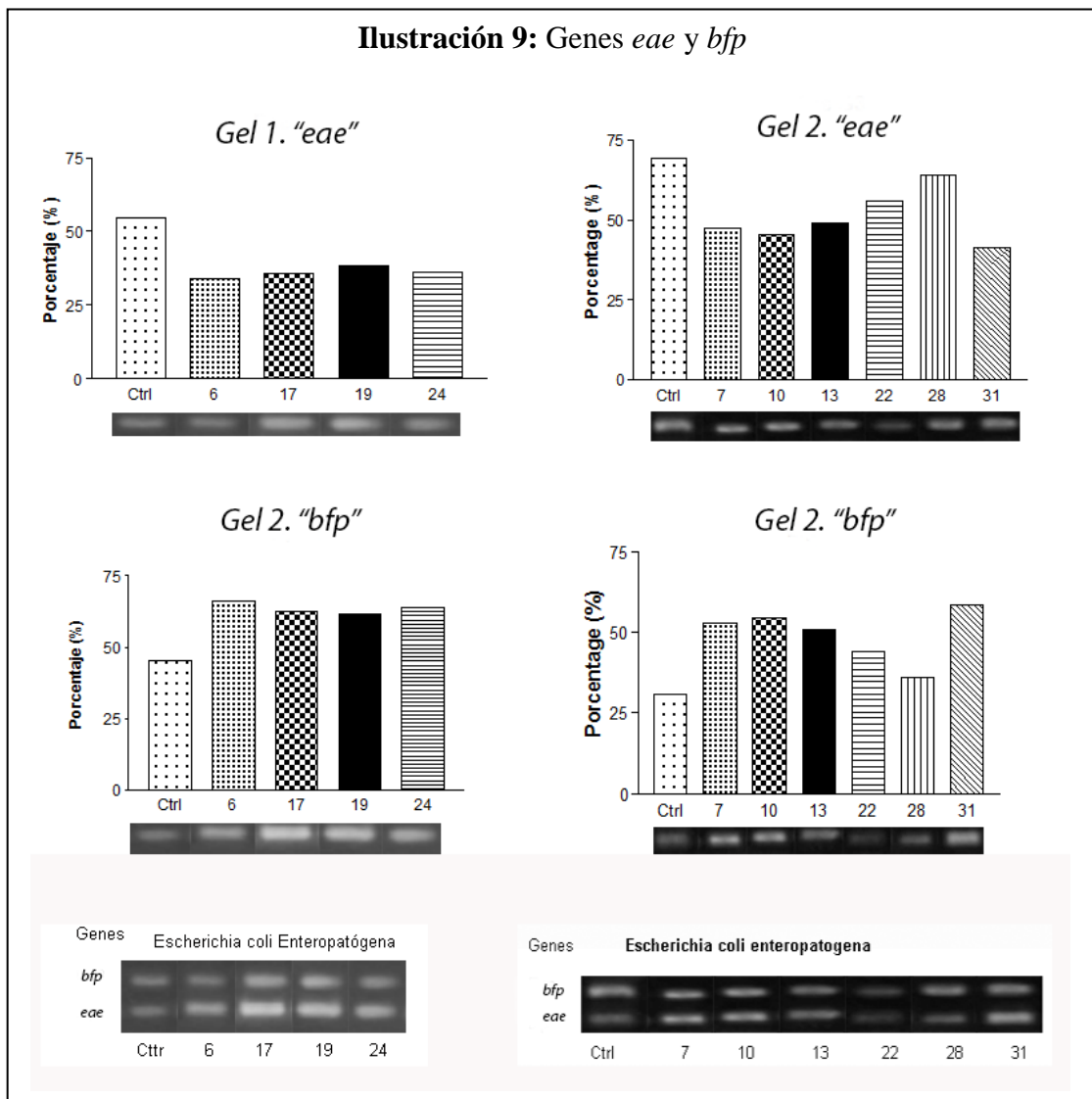
Después de revelar cada uno de los geles que contenían las muestras de *Escherichia coli* enteropatógena que estaban especificadas con los numero 1 – 94 se realizó el estudio de la Densidad Optica Relativa que fue expresado en porcentaje y se obtuvo como resultado que la mayoría de muestras se encontraban por encima del 80%; es decir que existe una concentración relativa óptima para el análisis realizado, (Ver ilustración N°5 y 6). De la totalidad de los 94 especímenes analizados se determinó que las muestras codificadas con los números 37 – 48 – 50 – 55 – 70 – 73 – 76 – 84 – 89 – 92 y 94 presentaron una amplificación para los dos genes (*eae* y *bfp*), por lo tanto pertenecen al

subtipo típico de *Escherichia coli* Enteropatógena (Ver ilustración N°6), mientras que en las muestras restantes la amplificación se obtuvo solo para el gen *eae* y de esta manera se determina que pertenecen al subtipo atípico de EPEC. Para realizar el corrimiento electroforético se utilizaron controles de carga de 100 pares de bases; el peso molecular del control positivo para los genes “*eae*” fue de 198.5 pb y para el gen *bfp* 255.3 pb (Ver Anexo N° 6). Se debe indicar que la significancia de los tratamientos fue evaluada por el test de ANOVA de una vía y Student-Newman-Keuls post-test, \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \* $p < 0.05$ ; y no se observaron diferencias significativas de los resultados en cada una de las muestras analizadas.

Ilustración 8. DOR (%) muestras analizadas



**Ilustración 9: Genes *eae* y *bfp***



### 4.3. Variabilidad genética

Definida como la variación en el material genético de una especie, que en el caso de esta investigación son los subtipos de *Escherichia coli* Enteropatogena; en donde los resultados de la Post-PCR fueron secuenciados con el fin de ratificar que el gen que se buscaba sea el correcto y por otro lado conocer si existe alguna variabilidad génica en las cepas estudiadas, (Ver tabla N°9).

**Tabla 9: Secuencias de muestras analizadas**

<b>Muestra N°</b>	<b>Gel N°</b>	<b>Identificación</b>	<b>Secuencia</b>
<b>8</b>	1	aEPEC	Ver anexo: 4-a
<b>21</b>	1	aEPEC	Ver anexo: 4-b
<b>3</b>	1	aEPEC	Ver anexo: 4-c
<b>23</b>	1	aEPEC	Ver anexo: 4-d
<b>11</b>	1	aEPEC	Ver anexo: 4-e
<b>28</b>	1	aEPEC	Ver anexo: 4-f
<b>6</b>	2	tEPEC	Ver anexo: 4-g
<b>9</b>	2	aEPEC	Ver anexo: 4-h
<b>14</b>	2	aEPEC	Ver anexo: 4-i
<b>17</b>	2	tEPEC	Ver anexo: 4-j
<b>24</b>	2	tEPEC	Ver anexo: 4-k
<b>29</b>	2	aEPEC	Ver anexo: 4-l
<b>1</b>	3	aEPEC	Ver anexo: 4-m
<b>7</b>	3	tEPEC	Ver anexo: 4-n
<b>22</b>	3	tEPEC	Ver anexo: 4-o
<b>23</b>	3	aEPEC	Ver anexo: 4-p
<b>26</b>	3	aEPEC	Ver anexo: 4-q
<b>30</b>	3	aEPEC	Ver anexo: 4-r

Fuente: Analisis realizados por la empresa MACROGEN.



## DISCUSIÓN

*Escherichia coli*, es una bacteria cosmopolita, es decir distribuida a nivel mundial y muy investigada. Se puede mencionar que es causante de cuadros disentéricos en todos los continentes. Esta patología se encuentra en tercer lugar de mortalidad alrededor del mundo (Organización Mundial de la Salud, 2008). Con el pasar de los años se descubre 6 patotipos de esta bacteria: Enteropatógeno, Enterohemorrágico, Enterotoxigénico, Enteroagregativo, Enteroinvasivo y Difuso-adherente (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2010), para el año 2013 un estudio realizado en la Pontificia Universidad Católica del Ecuador evidencia que el patotipo más prevalente de *E. coli* es el Enteropatógeno, con un 51.89%; (Datos no publicados).

En 1995 se dividió al patotipo Enteropatógeno en dos subtipos: típico y atípico, siendo la diferencia básica entre los dos patotipos la presencia del plásmido formador de pilis (*bfp*); además que el subtipo típico solo tiene como reservorio al ser humano (Hernández, Walder, & Vieira, 2009). En el subtipo atípico de *Escherichia coli* Enteropatógena las características genéticas de los serotipos es la producción de toxinas. Existen aspectos epidemiológicos con resistencias antibacterianas considerables que indican que este subtipo atípico es más evolucionado que su contraparte y se ha encontrado que en los países en vías de desarrollo, el subtipo atípico es una causa muy frecuente de diarreas agudas.

La prevalencia de los subtipos de EPEC es muy estricta, así pues, el subtipo típico es el menos prevalente y más común en poblaciones desarrolladas; mientras que el subtipo atípico es el más prevalente en todo tipo de poblaciones (Ochoa, Barletta, & Contreras, 2008). Otro estudio realizado en Irán en el año 2012 evidencia que la patogenia de la cepa atípica es mucho más simple y genera más morbilidad sobretodo en niños menores a 5 años de edad y que la prevalencia de esta cepa es del 96% y un 4% del subtipo típico (Jafari, Aslani, & Bouzari, 2012). Acercandonos más a nuestra región sudamericana y a la realidad ecuatoriana; en Perú en el año 2012 realizan una investigación para determinar la prevalencia de *Escherichia coli* patogénicas, en donde se establece que *Escherichia coli* enteropatógena subtipo atípico es el más prevalente con un 76,8%, es decir con 139 de 181 cepas analizadas mientras que el porcentaje restante pertenece al subtipo típico de la misma (Contreras, Ochoa, Ruiz, & Lacher, 2012). En corrientes (Argentina, 2010), se

determinó una prevalencia del 37% de EPEC, de los cuales el 6,1 % pertenecen a tEPEC y el 93,1% pertenecen a la cepa aEPEC (Medina, Esquivel, & Lifschitz, 2010). En nuestra investigación, al determinar la prevalencia de *Escherichia coli* enteropatógena; se pudo evidenciar que el subtipo atípico obtuvo una prevalencia del 90% y el subtipo típico del 10% con lo cual los datos obtenidos en el presente estudio se asemejan significativamente con los datos existentes en otros países Sudamericanos y están correlacionados con resultados obtenidos en estudios realizados en otras regiones y continentes diferentes.

En cuanto a la estandarización, la misma que se definió en esta investigación como una serie de parámetros, correctamente establecidos para la repetibilidad y reproducibilidad de la técnica de PCR convencional que al correlacionar con estudios realizados en diferentes países no concuerdan con la realidad de este estudio, debido a que cada una de las etapas de la PCR fue remodelada, ya que los procedimientos establecidos por los estudios de Francesca Barletta (Hendriksen, 2003) para la replicación de los primers y la determinación del límite de detección en el laboratorio de investigación de la Escuela de Bioanálisis de la PUCE no se obtuvo resultados similares con una replicación idéntica a la utilizada por dicha investigadora. Esto se debe a factores y/o variables como las diferencias geográficas y los cambios ambientales que existen en la ciudad de Barcelona, en comparación a la capital del Ecuador. Se debe considerar también que las variaciones de las técnicas y procedimientos de la reacción en cadena de la polimerasa que se realizaron en esta investigación fueron básicamente en la cantidad de ciclos y tiempos en el termociclado (Ver anexo N° 3). En contexto todos los cambios de procedimientos de la PCR convencional fueron comparados con un estudio realizado en el Ecuador (Trueba & Vieira, 2005), en donde las condiciones fueron significativamente similares a las del presente estudio. Con lo cual al realizar la PCR se obtuvieron rangos mayores de replicación y mejores resultados, y de esta manera se pudo determinar que las condiciones analíticas para la PCR sí son sugestivas de variación entre locaciones de estudio.

En relación al estudio génico realizado, se observó la ausencia de variabilidad genética dentro de los mecanismos de patogenia que se establecieron en esta investigación, se puede mencionar que se correlaciona perfectamente con las secuencias dadas por otros estudios, así pues la investigación realizada en la Universidad de Victoria (Water and Aquatic Sciences Research Program, Department of Biology, University of Victoria, 2014), (Canada), indica que los sectores conservados de los subtipos de EPEC no han

mutado, y esto se puede deber a la simpleza en los mecanismos de patogenia de cada uno de ellos, sobretodo a los existentes por aEPEC. Otras investigaciones realizadas por Donnenberg y Barletta (Donnenberg, Tzipori, & McKee, 2008) (Barletta, Ochoa , & Mercado , 2011), indican muy a fondo las características de los mecanismos de patogenia de la Enteropatógena y de sus subtipos, y se hace hincapie a que no existe una variabilidad en el material genético estudiado, lo que concuerda directamente con los nuestros resultados obtenidos en la presente investigación.

En resumen los datos obtenidos en la presente investigación indican la prevalencia de los dos patotipos analizados, con una mayor prevalencia del subtipo atípico. Se logró optimizar la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa lo que permitió obtener resultados estadísticamente significativos y además se conoció la variabilidad genética de los microorganismos investigados.

## CONCLUSIONES

1. Del total de muestras investigadas, es decir 96 muestras positivas para ser *Escherichia coli* enteropatógenas, el 10.41% fueron tipificadas como tEPEC, mientras el 89.58% fueron aEPEC.
2. La técnica PCR se encuentra correctamente estandarizada y optimizada, con tiempos de incubación y de termociclado perfectamente evaluados, los cuales pueden ser reproducidos para futuros estudios.
3. Luego de calcular la Densidad Óptica Relativa se concluye que los niveles de absorbancia que presenta la luminosidad de las muestras evidenciadas después del revelado de la corrida electroforética, no se evidenció diferencias significativas.
4. Se comprobó que no existe variabilidad genética en las secuencias investigadas y se corrobora que los genes analizados pertenecen al patotipo *Escherichia coli* enteropatógena.

## RECOMENDACIONES

- Con el presente estudio se genera el primer dato de prevalencia de sub-tipos de EPEC en la ciudad de Quito, con lo cual se genera la incógnita de cuál es la prevalencia de los patotipos de *E. coli* en el Ecuador y cómo es que estos afectan a la realidad de sanidad en el mismo?
- Al analizar los resultados de muchos coprocultivos negativos para *Shigella spp* ó *Salmonella spp.* se recomienda el uso de pruebas de identificación de subtipos y patotipos de *E. coli* para que el tratamiento y diagnóstico clínico sea mejorado ya que con esta investigación se prueba que muchos de los cuadros diarreicos agudos no se dan por estos patógenos.

## ANEXOS

### Anexo No 1: Equipos utilizados en esta investigación.

N°.	Tipo	Marca	Modelo	Referencia	Serie
1	Cámara de Flujo Laminar	C.B.S. Scientific.	P-1011004	----	----
2	Termociclador	Labnet	Multigene Optimax	TC-9610	1202020
3	Cámara de Electroforesis	C.B.S. Scientific	MGU-520T	----	6918
4	Microcentrífuga	Labnet	C-2500	G-6600	P-1011004
5	Pipetas de volumen variable	Labnet	----	----	----
6	Termometro	----	----	----	----
7	Microscopio	Olympus Corporation	CX21LEDFS1	1F88793	----
8	Incubadora	Memmert	----	----	----
9	Microondas	Panasonic	----	----	----
10	Micro-incubadora	Labnet	I-5110	NJ07095	6091109
11	Shaker	Gemmy	VRN-200	----	8653
12	Vortex	Heathrow	Sprout	----	HSA15996
13	NanoDrop2000	ThermoScientific	----	----	----
14	Criocongelador	Sanyo	MDF-U33V	----	8100274
15	Autoclave	Market-Forgot	----	----	----

**Anexo No 2:** Materiales utilizados en esta investigación.

<b>N°.</b>	<b>Tipo</b>	<b>Marca</b>	<b>Lote</b>
<b>1</b>	Kit de extracción	Wizard	87624
<b>2</b>	Cepas control	----	----
<b>3</b>	Puntas (1-20 uL)	Axygen	----
<b>4</b>	Puntas (1-200 uL)	Axygen	----
<b>5</b>	Puntas (100 – 10000 uL)	Axygen	----
<b>6</b>	Eppendorff (0.5 uL)	Axygen	----
<b>7</b>	Eppendorff (1 uL)	Axygen	----
<b>8</b>	Agarosa (500 gr)	Ultrapure	16500-500
<b>9</b>	Agar MacConkey	BBL	1667229
<b>10</b>	Agar Nutritivo	BBL	154285
<b>11</b>	Agua Molecular tipo I	Promega	68977
<b>12</b>	Ladder (50 bp)	Promega	41532
<b>13</b>	Blue/Orange Loading Dye	Promega	51462
<b>14</b>	SyberGreen (100 uL)	Promega	12458
<b>15</b>	GoTaq (200 uL)	Promega	136578

**Anexo No3:** Tabla abstracta de la estandarización de la técnica.

Master mix	Cantidad para una reacción	
Agua Molecular tipo I	8.5 Microlitros	
<i>Primer “eae” Forward</i>	0.75 Microlitros	
<i>Primer “eae” Reverse</i>	0.75 Microlitros	
<i>Primer “bfp” Forward</i>	0.75 Microlitros	
<i>Primer “bfp” Reverse</i>	0.75 Microlitros	
Go Taq Polimerasa	12.5 Microlitros	
ADN EPEC	1 Microlitro	
Proceso	Temperatura	Tiempo
Denaturación inicial	94°C	5’
Denaturación de primers	94°C	0:45’’
Alineamiento de primers	57°C	0.45’’
Elongación de primers	72°C	0.45’’
Elongación Final	74°C	10’
Conservación	4°C	Infinito
Concentración de agarosa	0.5%	
Cantidad de agarosa	1.5 mg	
Cantidad de agua	100 ml	
Tiempo de dilución	0:1’:35’’	
Cantidad de Sybergreen	0.3µl	
Tiempo de espera de enfriamiento	25 minutos	
Dilución DNA/Blue	Muestra: 5µl,	
	Reagente: 5µl	
	Dilución: 1/1.	
Cantidad de muestra a cargar	5µl	
Tiempo de Electroforesis	60 minutos	
Voltaje de Electroforesis	90 voltios	
Miliamperaje de electroforesis	120 miliamperios	



#### Anexo No 4:

##### a) Secuencia muestra N° 8 aECEP.

1 atgattactc atggttttta tgcccggacc cggcacaagc ataagctaaa aaaaacattt  
61 attatgetta gtgctgggtt aggattgttt tttatgtta accagaattc atttgcaaac  
121 ggcgaaaatt attttaatt gagttcagat tcaaaactgt taactcaaaa tgccgctcag  
181 gategccttt tttatacgtt aaaaacaggt gaaactgttg ccaatatttc taaatcacag  
241 ggtatcagtt tatcggtaat ttggctactg aataaacatt tatacagttc cgaaagcgaa  
301 atgatgaagg ctggacctgg tcagcagatc atttgccac taaaaaact gtctgttgaa  
361 tatagtgect tacctgtctt aggttcggca cctgttgtt ctgcaggtgg tgcactggt  
421 catacgaata aaatgactaa aatgtccccg gacgtgacta aaagcaacac gaccgatgac  
481 aaggetctaa attatgggc acaacaggcc ggcagccttg gtagccagct tcagtcgcgc  
541 tcaactgaac gcgattacgc gaaagatacc gctcttggt tggccagcag ccaggcttca  
601 tcacagttgc aggcctggtt acaacattat ggaacggcag aggttaatct gcagagcgg  
661 aataactttg acggtagttc actggacttc ttattaccgt tctatgattc cgaaaatatg  
721 ctggcatttg gtcaggtcgg ggcgcgttac attgactccc gctttacggc aaatttaggt  
781 gctggccagc gtttttct tctgaaaat atgtgggct ataactgtt cattgatcag  
841 gattttctg gtgataatac ccgttaggt attggggcg aatactggcg agactatttc  
901 aaaagtagcg ttaacggcta ttccgcag agcggctggc atgagtcata caataagaaa  
961 gactatgatg agcggccggc aaatggttt gatatccgt ttaatggcta ttaccatca  
1021 tatccggcat taggcgcaa actgatgtac gaacagtatt atggtgataa tgttgctttg  
1081 ttaattccg ataagttgca gtcgaatct ggcgcggcga ccgttggtgt aaactacact  
1141 ccgattcctc tggtagcat ggggatcat taccgtcatg gtacgggtaa tgaaaatgat  
1201 ctctttact caatgcagtt ccgttatcag ttgataaac cgtggtctca gcaaatcgag  
1261 ccacagtatg ttaacagtt aagaacatta tcgggcagcc gttacgatct ggttcagcgt  
1321 aataacaata ttattctgga gtacaaaag caggatattc ttctctgaa tattccgat  
1381 gatattaatg gtactgaaca cagtacgcag aagattcaat tgatcgttaa gagcaaatat  
1441 ggtctggatc gtatcgtctg ggatgatagt gcattacgca gtcagggcgg tcagattcag  
1501 catagcggaa gccaaagcg acaagactac caggctattt gcctgctta tgtgcaaggt  
1561 ggcagcaata ttataaagt gaccgctcgc gcctatgacc gaaatggtaa tagttctaat

1621 aatgtacagc tcaactattac cgttttaccg aatgggcagg ttgtggacca ggttgggta  
 1681 acggacttta cggctgataa gacatcggct aaagcggata acgttgatac cattacttat  
 1741 accgcgacgg ttaaaaagaa tgggtagct caggctaag cccctgtaac atttagtatt  
 1801 gtatccggga ctgcaactct cggagcaaat agtgccaaaa cggatggtaa cggtaggca  
 1861 accgtaacgt tgaagtcggg tacgccaggg caggctcgtg tgtctgctaa aaccgcggag  
 1921 atgacttcgc cacttaatgc cagtgcgggt atattgttg atcaaacca ggccagcatt  
 1981 actgagatta aggctgataa aacaacagcg aaggcaaatg gttctgatgc gattacctat  
 2041 actgttaaag taatgaagaa taaccaacca gaagcaaacc attctgttac atttcaacg  
 2101 aactttgta atctgggggg gaattcta atccaaattg tgaacggg taaagatgt  
 2161 agggctacgg taaaactgac atctggcgtt gcaggtaatg ctattgttag tgcaaaagtc  
 2221 agcgaagtta atacagaggt taaggctcct gaggtaaaat tcttctcagt tctgagcatt  
 2281 gatagtaatg ttaatatat tggaacctct gctactggcg cttgcctaa tatttggtg  
 2341 caatatggtc agttcaaatt gactgctaaa ggtggtgatg ggaaatatca atggcgctct  
 2401 caagatccaa aagttgcatc agttgatgct ttaactggtc gagttacttt gttgaagaa  
 2461 ggaacaacaa caattgaagt tgtgtcgggt gataacaaa ctgcaacgta tacaattaat  
 2521 acacctataa aaattatata tgtggagaca aaaaataaag tagtctataa cgatgctgaa  
 2581 gcaatatgta gaacgaataa tggccgttta ccgctatcta cgaatgagtt aaaggacgtg  
 2641 tataataaat ggggagcggc caatagttat gaaggctata aaggtaaaaa cacaataaca  
 2701 gcatggactc agcaaacaga ggatgataaa actaaagggt ggactagtag atttgacata  
 2761 gttactaaaa atgaaatccc tagtaatgga agtaataata aggtcaatgt gacagcagct  
 2821 aatgcctttg ctgtctgtgt aagatga

**b) Secuencia muestra N° 21 aEPEC.**

1 atgattactc atggttttta tgcccgacc cggcacaagc ataagctaaa aaaaacattt  
61 attatgctta gtgctgggtt aggattgtt tttatgtta accagaattc atttgcaaac  
121 ggcgaaaatt attttaaatt gagttcagat tcaaaactgt taactcaaaa tgccgctcag  
181 gatgccttt ttatacgtt aaaaacaggt gaaactgttg ccaatatttc taaatcacag  
241 ggtatcagtt tateggtaat ttggtcactg aataaacatt tatacagttc cgaaagcgaa  
301 atgatgaagg ctggacctgg tcagcagatc atttgccac tcaaaaaact gtctgttgaa  
361 tatagtgcct tacctgtctt aggttcggca cctgttgtt ctgcaggtgg tgcactggt  
421 catacgaata aatgactaa aatgtccccg gacgtgacta aaagcaacac gaccgatgac  
481 aaggtcttaa attatgcggc acaacaggcc gcgagccttg gtagccagct tcagtcgcgc  
541 tcaactgaac gcgattacgc gaaagatacc gctcttggtg tggccagcag ccaggcttca  
601 tcacagttgc aggcctggtt acaacattat ggaacggcag aggttaatct gcagagcgg  
661 aataactttg acggtagttc actggacttc ttattaccgt tctatgattc cgaaaatatg  
721 ctggcatttg gtcaggtcgg ggcgcgttac attgactccc gcttacggc aaatttaggt  
781 gctggccagc gtttttct tctgaaaat atgtgggct ataacgtctt cattgatcag  
841 gattttctg gtgataatac cgttttaggt attgggggcg aatactggcg agactatttc  
901 aaaagtagcg ttaacggcta ttccgcatg agcggctggc atgagtcata caataagaaa  
961 gactatgatg agcgcccgcc aatggttt gatatccgt ttaatggcta ttaccatca  
1021 tatccggcat taggcgcaa actgatgtac gaacagtatt atggtgataa tgttgcttg  
1081 tttaattccg ataagttgca gtcgaatcct ggcgcggcga ccgttggtgt aaactacact  
1141 ccgattcctc tggtagcat ggggatcatg taccgtcatg gtacgggtaa tgaaaatgat  
1201 ctctttact caatgcagtt ccgttatcag ttgataaac cgtggtctca gcaaatcgag  
1261 ccacagtatg ttaacagtt aagaacatta tcgggcagcc gttacgatct gggtcagcgt  
1321 aataacaata ttattctgga gtacaaaaag caggatattc ttctctgaa tattccgat  
1381 gatattaatg gtactgaaca cagtacgcag aagattcaat tgatcgtaa gagcaaatat  
1441 ggtctggatc gtatcgtctg ggatgatagt gcattacgca gtcagggcgg tcagattcag  
1501 catagcgga gccaagcgc acaagactac caggctattt tgctgctta tgtgaagg  
1561 ggcagcaata ttataaagt gaccgctgc gcctatgacc gaaatggtaa tagttcta  
1621 aatgtacagc tcaactattc cgtttaccg aatgggcagg ttgtggacca ggttgggta  
1681 acggacttta cggctgataa gacatcggct aaagcggata acgttgatac cattacttat

1741 accgcgacgg ttaaaaagaa tgggtgtagct caggctaatag cccctgtaac atttagtatt  
1801 gtatccggga ctgcaactct cggagcaaat agtgccaaaa cggatggtaa cggtaggca  
1861 accgtaacgt tgaagtcggg tacgccaggg caggctcgcg tgtctgctaa aaccgcggag  
1921 atgacttcgc cacttaatgc cagtgcggtt atattgttg atcaaaccaa ggccagcatt  
1981 actgagatta aggctgataa aacaacagcg aaggcaaatg gttctgatgc gattacctat  
2041 actgttaaag taatgaagaa taaccaacca gaagcaaacc attctgttac atttcaacg  
2101 aactttggta atctgggggg gaattctaata acccaaattg tgaaaacgga taaagatggt  
2161 agggctacgg taaaactgac atctggcggt gcaggtaatg ctattgttag tgcaaaagtc  
2221 agcgaagtta atacagaggt taaggctcct gaggtaaaat tcttctcagt tctgagcatt  
2281 gatagtaatg ttaatatat tggaacctct gctactggcg ctttgcctaa tatttggttg  
2341 caatatggtc agttcaaatt gactgctaaa ggtgggtgat ggaaatatca atggcgctct  
2401 caagatccaa aagttgcatc agttgatgct ttaactggtc gagttacttt gttgaagaaa  
2461 ggaacaacaa caattgaagt tgtgtcgggt gataaccaa ctgcaacgta tacaattaat  
2521 acacctataa aaattatatac tgtggagaca aaaaataaag tagtctataa cgatgctgaa  
2581 gcaatatgta gaacgaataa tggccgttta ccgctatcta cgaatgagtt aaaggacgtg  
2641 tataataaat ggggagcggc caatagtat gaaggctata aaggtaaaaa cacaataaca  
2701 gcatggactc agcaaacaga ggatgataaa actaaagggt ggactagtac atttgacata  
2761 gttactaaaa atgaaatccc tagtaatgga agtaataata aggtcaatgt gacagcagct  
2821 aatgcctttg ctgtctgtgt aagatga

c) **Secuencia muestra N° 3 aEPEC.**

1 atgattactc atggttttta tgcccgacc cggcacaagc ataagctaaa aaaaacattt  
61 attatgctta gtgctgggtt aggattgtt tttatgtta accagaattc atttgcaaac  
121 ggcgaaaatt attttaaatt gagttcagat tcaaaactgt taactcaaaa tgccgctcag  
181 gatgccttt ttatacgtt aaaaacaggt gaaactgttg ccaatatttc taaatcacag  
241 ggtatcagtt tateggtaat ttggtcactg aataaacatt tatacagttc cgaaagcgaa  
301 atgatgaagg ctggacctgg tcagcagatc atttgccac tcaaaaaact gtctgttgaa  
361 tatagtgcct tacctgtctt aggttcggca cctgttgtt ctgcaggtgg tgcactggt  
421 catacgaata aatgactaa aatgtccccg gacgtgacta aaagcaacac gaccgatgac  
481 aaggtcttaa attatgcggc acaacaggcc gcgagccttg gtagccagct tcagtcgcgc  
541 tcaactgaac gcgattacgc gaaagatacc gctcttggtg tggccagcag ccaggcttca  
601 tcacagttgc aggcctgggt acaacattat ggaacggcag aggttaatct gcagagcgg  
661 aataactttg acggtagttc actggacttc ttattaccgt tctatgattc cgaaaatatg  
721 ctggcatttg gtcaggtcgg ggcgcgttac attgactccc gcttacggc aaatttaggt  
781 gctggccagc gtttttct tctgaaaat atgtgggct ataacgtctt cattgatcag  
841 gattttctg gtgataatac cgttttaggt attgggggcg aatactggcg agactatttc  
901 aaaagtagcg ttaacggcta ttccgcatg agcggctggc atgagtcata caataagaaa  
961 gactatgatg agcgcccggc aaatggttt gatatccgt ttaatggcta ttaccatca  
1021 tatccggcat taggcgcaa actgatgtac gaacagtatt atggtgataa tgttgcttg  
1081 tttaattccg ataagttgca gtcgaatcct ggcgcggcga ccgttggtgt aaactacact  
1141 ccgattcctc tggtagcat ggggatcatg taccgtcatg gtacgggtaa tgaaaatgat  
1201 ctctttact caatgcagtt ccgttatcag ttgataaac cgtggtctca gcaaatcgag  
1261 ccacagtatg ttaacagatt aagaacatta tcgggcagcc gttacgatct ggttcagcgt  
1321 aataacaata ttattctgga gtacaaaaag caggatattc ttctctgaa tattccgat  
1381 gatattaatg gtactgaaca cagtacgcag aagattcaat tgatcgtaa gagcaaatat  
1441 ggtctggatc gtatcgtctg ggatgatagt gcattacgca gtcagggcgg tcagattcag  
1501 catagcgga gccaagcgc acaagactac caggctattt tgctgctta tgtgaagg  
1561 ggcagcaata ttataaagt gaccgctcgc gcctatgacc gaaatggtaa tagttcta  
1621 aatgtacagc tcaactattc cgtttaccg aatgggcagg ttgtggacca ggttggggt  
1681 acggacttta cggctgataa gacatcggct aaagcggata acgttgatac cattacttat

1741 accgcgacgg ttaaaaagaa tgggtgtagct caggctaattg cccctgtaac atttagtatt  
1801 gtatccggga ctgcaactct cggagcaaatt agtgccaaaa cggatggtaa cggtaggca  
1861 accgtaacgt tgaagtcggg tacgccaggg caggctcgtg tgtctgctaa aaccgcggag  
1921 atgacttcgc cacttaatgc cagtgcgggtt atattgttg atcaaaccaa ggccagcatt  
1981 actgagatta aggctgataa aacaacagcg aaggcaaattg gttctgatgc gattacctat  
2041 actgttaaag taatgaagaa taaccaacca gaagcaaacc attctgttac attctcaacg  
2101 aactttggta atctgggggg gaattctaatt acccaaattg tgaaaacgga taaagatggt  
2161 agggctacgg taaaactgac atctggcggt gcaggtaattg ctattgttag tgcaaaagtc  
2221 agcgaagtta atacagaggt taaggctcct gaggtaaaat tcttctcagt tctgagcatt  
2281 gatagtaattg ttaattatat tggaacctct gctactggcg ctttgcctaa tatttggttg  
2341 caatatggtc agttcaaatt gactgctaaa ggtgggtgat ggaaatatca atggcgctct  
2401 caagatccaa aagttgcatc agttgatgct ttaactggtc gagttacttt gttgaagaaa  
2461 ggaacaacaa caattgaagt tgtgtcgggt gataaccaa ctgcaacgta tacaattaat  
2521 acacctataa aaattatatc tgtggagaca aaaaataaag tagtctataa cgatgctgaa  
2581 gcaatatgta gaacgaataa tggccgttta ccgctatcta cgaatgagtt aaaggacgtg  
2641 tataataaat ggggagcggc caatagtatt gaaggctata aaggtaaaaa cacaataaca  
2701 gcatggactc agcaaacaga ggatgataaa actaaagggt ggactagtac atttgacata  
2761 gttactaaaa atgaaatccc tagtaatgga agtaataata aggtcaatgt gacagcagct  
2821 aatgcctttg ctgtctgtgt aagatga

**d) Secuencia muestra N° 23 aEPEC.**

1 atgattactc atggttttta tgcccgacc cggcacaagc ataagctaaa aaaacattt  
61 attatgctta gtgctggtt aggattgtt tttatgta accagaattc atttgcaaac  
121 ggcgaaaatt attttaaatt gagttcagat tcaaaactgt taactcaaaa tgccgctcag  
181 gatgccttt ttatacgtt aaaaacaggt gaaactgtt ccaatattc taaatcacag  
241 ggtatcagtt tateggtaat ttggtcactg aataaacatt tatacagttc cgaaagcgaa  
301 atgatgaagg ctggacctgg tcagcagatc atttgccac tcaaaaaact gtctgttgaa  
361 tatagtgcct tacctgtctt aggttcggca cctgttgtt ctgcaggtgg tgcactggt  
421 catacgaata aatgactaa aatgtccccg gacgtgacta aaagcaacac gaccgatgac  
481 aaggtcttaa attatgcggc acaacaggcc gcgagcctt gtagccagct tcagtcgcgc  
541 tactgaacg gcgattacgc gaaagatacc gctcttgta tggccagcag ccaggcttca  
601 tcacagttgc aggcctggtt acaacattat ggaacggcag aggttaatct gcagagcgt  
661 aataactttg acggtagttc actggacttc ttattaccgt tctatgattc cgaaaatatg  
721 ctggcatttg gtcaggtcgg ggcgcgttac attgactccc gcttacggc aaatttaggt  
781 gctggccagc gtttttct tctgaaaat atgtgggct ataacgtctt cattgatcag  
841 gattttctg gtgataatac cgttttaggt attgggggcg aatactggcg agactattc  
901 aaaagtagcg ttaacggcta ttccgcatg agcggctggc atgagtcata caataagaaa  
961 gactatgatg agcgcccgcc aatggtttt gatatccgt ttaatggcta ttaccatca  
1021 tatccggcat taggcgcaa actgatgtac gaacagtatt atggtgataa tgttgcttg  
1081 tttaattccg ataagttgca gtcgaatcct ggcgcggcga ccgttggtgt aaactacact  
1141 ccgattcctc tggtagcat ggggatcatg taccgtcatg gtacgggtaa tgaaaatgat  
1201 ctctttact caatgcagtt ccgttatcag ttgataaac cgtggtctca gcaaatcgag  
1261 ccacagtatg ttaacagtt aagaacatta tcgggcagcc gttacgatct gggtcagcgt  
1321 aataacaata ttattctgga gtacaaaaag caggatattc ttctctgaa tattccgat  
1381 gatattaatg gtactgaaca cagtacgcag aagattcaat tgatcgtaa gagcaaata  
1441 ggtctggatc gtatgtctg ggatgatagt gcattacgca gtcagggcgg tcagattcag  
1501 catagcgga gccaagcgc acaagactac caggctattt tgctgctta tgtgaaggt  
1561 ggcagcaata ttataaagt gaccgctgc gcctatgacc gaaatggtaa tagttcta  
1621 aatgtacagc tcatattac cgtttaccg aatgggcagg ttgtggacca ggttgggta  
1681 acggacttta cggctgataa gacatcggct aaagcggata acgttgatac cattacttat

1741 accgcgacgg ttaaaaagaa tgggtgtagct caggctaattg cccctgtaac atttagtatt  
1801 gtatccggga ctgcaactct cggagcaaatt agtgccaaaa cggatggtaa cggtaggca  
1861 accgtaacgt tgaagtcggg tacgccaggg caggctcgtg tgtctgctaa aaccgcggag  
1921 atgacttcgc cacttaatgc cagtgcggtt atattgttg atcaaaccaa ggccagcatt  
1981 actgagatta aggctgataa aacaacagcg aaggcaaattg gttctgatgc gattacctat  
2041 actgttaaag taatgaagaa taaccaacca gaagcaaacc attctgttac atttcaacg  
2101 aactttggta atctgggggg gaattctaatt acccaaattg tgaaaacgga taaagatggt  
2161 agggctacgg taaaactgac atctggcggt gcaggtaattg ctattgttag tgcaaaagtc  
2221 agcgaagtta atacagaggt taaggctcct gaggtaaaat tcttctcagt tctgagcatt  
2281 gatagtaattg ttaattatat tggaacctct gctactggcg ctttgcctaa tatttggttg  
2341 caatatggtc agttcaaatt gactgctaaa ggtgggtgat ggaaatatca atggcgctct  
2401 caagatccaa aagttgcatc agttgatgct ttaactggtc gagttacttt gttgaagaaa  
2461 ggaacaacaa caattgaagt tgtgtcgggt gataaccaa ctgcaacgta tacaattaat  
2521 acacctataa aaattatatc tgtggagaca aaaaataaag tagtctataa cgatgctgaa  
2581 gcaatatgta gaacgaataa tggccgttta ccgctatcta cgaatgagtt aaaggacgtg  
2641 tataataaat ggggagcggc caatagtatt gaaggctata aaggtaaaaa cacaataaca  
2701 gcatggactc agcaaacaga ggatgataaa actaaagggt ggactagtac atttgacata  
2761 gttactaaaa atgaaatccc tagtaatgga agtaataata aggtcaatgt gacagcagct  
2821 aatgcctttg ctgtctgtgt aagatga



**e) Secuencia muestra N° 11 aEPEC.**

1 atgattactc atggttttta tgcccgacc cggcacaagc ataagctaaa aaaacattt  
61 attatgctta gtgctggtt aggattgtt tttatgta accagaattc atttgcaaac  
121 ggcgaaaatt attttaaatt gagttcagat tcaaaactgt taactcaaaa tgccgctcag  
181 gatgccttt ttatacgtt aaaaacaggt gaaactgtt ccaatattc taaatcacag  
241 ggtatcagtt tateggta tgggtcactg aataaacatt tatacagttc cgaaagcgaa  
301 atgatgaagg ctggacctgg tcagcagatc atttgccac tcaaaaaact gtctgttgaa  
361 tatagtgcct tacctgtctt aggttcggca cctgtgttg ctgcaggtgg tgcactggt  
421 catacgaata aatgactaa aatgtccccg gacgtgacta aaagcaacac gaccgatgac  
481 aaggtcttaa attatgcggc acaacaggcc gcgagccttg gtagccagct tcagtcgcgc  
541 tcaactgaac gcgattacgc gaaagatacc gctcttgta tggccagcag ccaggcttca  
601 tcacagttgc aggcctggtt acaacattat ggaacggcag aggttaatct gcagagcgt  
661 aataacttg acggtagttc actggacttc ttattaccgt tctatgattc cgaaaatatg  
721 ctggcatttg gtcaggtcgg ggcgcgttac attgactccc gcttacggc aaatttaggt  
781 gctggccagc gtttttct tctgaaaat atgtgggct ataacgtctt cattgatcag  
841 gattttctg gtgataatac cgttttaggt attgggggcg aatactggcg agactattc  
901 aaaagtagcg ttaacggcta ttccgcatg agcggctggc atgagtcata caataagaaa  
961 gactatgatg agcgcccgcc aatggtttt gatatccgt ttaatggcta ttaccatca  
1021 tatccggcat taggcgcaa actgatgtac gaacagtatt atggtgataa tgttgcttg  
1081 tttaattccg ataagttgca gtcgaatcct ggcgcggcga ccgttggtgt aaactacact  
1141 ccgattcctc tggtgacgat ggggatcgt taccgtcatg gtacgggtaa tgaaaatgat  
1201 ctctttact caatgcagtt ccgttatcag ttgataaac cgtggtctca gcaaatcgag  
1261 ccacagtatg ttaacagtt aagaacatta tcgggcagcc gttacgatct ggttcagcgt  
1321 aataacaata ttattctgga gtacaaaaag caggatattc ttctctgaa tattccgat  
1381 gatattaatg gtactgaaca cagtacgcag aagattcaat tgatcgtaa gagcaaatat  
1441 ggtctggatc gtatcgtctg ggatgatagt gcattacgca gtcagggcgg tcagattcag  
1501 catagcgga gccaagcgc acaagactac caggctattt tgctgctta tgtgcaaggt  
1561 ggcagcaata ttataaagt gaccgctgc gcctatgacc gaaatggtaa tagttcta  
1621 aatgtacagc tcaactattc cgtttaccg aatgggcagg ttgtggacca ggttgggta  
1681 acggacttta cggctgataa gacatcggct aaagcggata acgttgatac cattacttat

1741 accgcgacgg ttaaaaagaa tgggtgtagct caggctaatag cccctgtaac atttagtatt  
1801 gtatccggga ctgcaactct cggagcaaata agtgccaaaa cggatggtaa cggtaggca  
1861 accgtaacgt tgaagtcggg tacgccaggg caggctcgcg tgtctgctaa aaccgcggag  
1921 atgacttcgc cacttaatgc cagtgcgggt atattgttg atcaaaccaa ggccagcatt  
1981 actgagatta aggctgataa aacaacagcg aaggcaaatg gttctgatgc gattacctat  
2041 actgttaaag taatgaagaa taaccaacca gaagcaaacc attctgttac attctcaacg  
2101 aactttggta atctgggggg gaattctaata acccaaattg tgaaaacgga taaagatggt  
2161 agggctacgg taaaactgac atctggcggt gcaggtaatg ctattgttag tgcaaaagtc  
2221 agcgaagtta atacagaggt taaggctcct gaggtaaaat tctctcagt tctgagcatt  
2281 gatagtaatg ttaatatat tggaacctct gctactggcg cttgcctaa tatttggttg  
2341 caatatggtc agttcaaatt gactgctaaa ggtgggtgat ggaaatatca atggcgctct  
2401 caagatccaa aagttgcatc agttgatgct ttaactggtc gagttacttt gttgaagaaa  
2461 ggaacaacaa caattgaagt tgtgtcgggt gataaccaa ctgcaacgta tacaattaat  
2521 acacctataa aaattatatac tgtggagaca aaaaataaag tagtctataa cgatgctgaa  
2581 gcaatatgta gaacgaataa tggccgttta ccgctatcta cgaatgagtt aaaggacgtg  
2641 tataataaat ggggagcggc caatagtat gaaggctata aaggtaaaaa cacaataaca  
2701 gcatggactc agcaaacaga ggatgataaa actaaagggt ggactagtac atttgacata  
2761 gttactaaaa atgaaatccc tagtaatgga agtaataata aggtcaatgt gacagcagct  
2821 aatgcctttg ctgtctgtgt aagatga

**f) Secuencia muestra N° 28 aEPEC.**

1 atgattactc atggttttta tgcccgacc cggcacaagc ataagctaaa aaaacattt  
61 attatgctta gtgctggtt aggattgtt tttatgta accagaattc atttgcaaac  
121 ggcgaaaatt attttaaatt gagttcagat tcaaaactgt taactcaaaa tgccgctcag  
181 gatgccttt ttatacgtt aaaaacaggt gaaactgtt ccaatattc taaatcacag  
241 ggtatcagtt tateggtaat ttggtcactg aataaacatt tatacagttc cgaaagcgaa  
301 atgatgaagg ctggacctgg tcagcagatc atttgccac tcaaaaaact gtctgttgaa  
361 tatagtgcct tacctgtctt aggttcggca cctgttgtt ctgcaggtgg tgcactggt  
421 catacgaata aatgactaa aatgtccccg gacgtgacta aaagcaacac gaccgatgac  
481 aaggtcttaa attatgcggc acaacaggcc gcgagcctt gtagccagct tcagtcgcgc  
541 tcaactgaac gcgattacgc gaaagatacc gctcttgta tggccagcag ccaggcttca  
601 tcacagttgc aggcctggtt acaacattat ggaacggcag aggttaatct gcagagcgg  
661 aataactttg acggtagttc actggacttc ttattaccgt tctatgattc cgaaaatatg  
721 ctggcatttg gtcaggtcgg ggcgcgttac attgactccc gcttacggc aaatttaggt  
781 gctggccagc gtttttct tctgaaaat atgtgggct ataacgtctt cattgatcag  
841 gattttctg gtgataatac cgttttaggt attgggggcg aatactggcg agactatttc  
901 aaaagtagcg ttaacggcta ttccgcatg agcggctggc atgagtcata caataagaaa  
961 gactatgatg agcgcccgcc aatggttt gatatccgt ttaatggcta ttaccatca  
1021 tatccggcat taggcgcaa actgatgtac gaacagtatt atggtgataa tgttgcttg  
1081 tttaattccg ataagttgca gtcgaatcct ggcgcgccga ccgttggtgt aaactacact  
1141 ccgattcctc tggtgacgat ggggatcgt taccgtcatg gtacgggtaa tgaaaatgat  
1201 ctctttact caatgcagtt ccgttatcag ttgataaac cgtggtctca gcaaatcgag  
1261 ccacagtatg ttaacagtt aagaacatta tcgggcagcc gttacgatct gggtcagcgt  
1321 aataacaata ttattctgga gtacaaaaag caggatattc ttctctgaa tattccgat  
1381 gatattaatg gtactgaaca cagtacgcag aagattcaat tgatcgtaa gagcaaatat  
1441 ggtctggatc gtatcgtctg ggatgatagt gcattacgca gtcagggcgg tcagattcag  
1501 catagcgga gccaagcgc acaagactac caggctattt tgctgctta tgtgaaggt  
1561 ggcagcaata ttataaagt gaccgctgc gcctatgacc gaaatggtaa tagttcta  
1621 aatgtacagc tcaactattc cgtttaccg aatgggcagg ttgtggacca ggttgggta  
1681 acggacttta cggctgataa gacatcggct aaagcggata acgttgatac cattacttat

1741 accgcgacgg ttaaaaagaa tgggtgtagct caggctaattg cccctgtaac atttagtatt  
1801 gtatccggga ctgcaactct cggagcaaatt agtgccaaaa cggatggtaa cggtaggca  
1861 accgtaacgt tgaagtcggg tacgccaggg caggctcgtg tgtctgctaa aaccgcggag  
1921 atgacttcgc cacttaatgc cagtgcgggtt atattgttg atcaaaccaa ggccagcatt  
1981 actgagatta aggctgataa aacaacagcg aaggcaaattg gttctgatgc gattacctat  
2041 actgttaaag taatgaagaa taaccaacca gaagcaaacc attctgttac attctcaacg  
2101 aactttggta atctgggggg gaattctaatt acccaaattg tgaaaacgga taaagatggt  
2161 agggctacgg taaaactgac atctggcggt gcaggtaattg ctattgttag tgcaaaagtc  
2221 agcgaagtta atacagaggt taaggctcct gaggtaaaat tcttctcagt tctgagcatt  
2281 gatagtaattg ttaattatat tggaacctct gctactggcg ctttgcctaa tatttggttg  
2341 caatatggtc agttcaaatt gactgctaaa ggtgggtgatg ggaaatatca atggcgctct  
2401 caagatccaa aagttgcatc agttgatgct ttaactggtc gagttacttt gttgaagaaa  
2461 ggaacaacaa caattgaagt tgtgtcgggt gataaccaa ctgcaacgta tacaattaat  
2521 acacctataa aaattatatc tgtggagaca aaaaataaag tagtctataa cgatgctgaa  
2581 gcaatatgta gaacgaataa tggccgttta ccgctatcta cgaatgagtt aaaggacgtg  
2641 tataataaat ggggagcggc caatagtatt gaaggctata aaggtaaaaa cacaataaca  
2701 gcatggactc agcaaacaga ggatgataaa actaaagggt ggactagtagc atttgacata  
2761 gttactaaaa atgaaatccc tagtaatgga agtaataata aggtcaatgt gacagcagct  
2821 aatgcctttg ctgtctgtgt aagatga

**g) Secuencia muestra N° 37 tEPEC.**

1 atgattactc atggttttta tgcccgacc cggcacaagc ataagctaaa aaaacattt  
61 attatgctta gtgctggtt aggattgtt tttatgta accagaattc atttgcaaac  
121 ggcgaaaatt attttaaatt gagttcagat tcaaaactgt taactcaaaa tgccgctcag  
181 gatgccttt ttatacgtt aaaaacaggt gaaactgtt ccaatattc taaatcacag  
241 ggtatcagtt tateggta tttggtcactg aataaacatt tatacagttc cgaaagcgaa  
301 atgatgaagg ctggacctgg tcagcagatc atttgccac tcaaaaaact gtctgttgaa  
361 tatagtgcct tacctgtctt aggttcggca cctgtgttg ctgcaggtgg tgtcactggt  
421 catacgaata aatgactaa aatgtccccg gacgtgacta aaagcaacac gaccgatgac  
481 aaggtcttaa attatgcggc acaacaggcc gcgagccttg gtagccagct tcagtcgcgc  
541 tcaactgaac gcgattacgc gaaagatacc gctcttgta tggccagcag ccaggcttca  
601 tcacagttgc aggcctggtt acaacattat ggaacggcag aggttaatct gcagagcgg  
661 aataactttg acggtagttc actggacttc ttattaccgt tctatgattc cgaaaatatg  
721 ctggcatttg gtcaggtcgg ggcgcgttac attgactccc gcttacggc aaatttaggt  
781 gctggccagc gtttttct tctgaaaat atgtgggct ataacgtctt cattgatcag  
841 gattttctg gtgataatac cgttttaggt attgggggcg aatactggcg agactattc  
901 aaaagtagcg ttaacggcta ttccgcatg agcggctggc atgagtcata caataagaaa  
961 gactatgatg agcgcccgcc aatggttt gatatccgt ttaatggcta ttaccatca  
1021 tatccggcat taggcgcaa actgatgtac gaacagtatt atggtgataa tgttgcttg  
1081 tttaattccg ataagttgca gtcgaatcct ggcgcggcga ccgttggtgt aaactacact  
1141 ccgattcctc tggtagcat ggggatcatg taccgcatg gtacgggtaa tgaaaatgat  
1201 ctctttact caatgcagtt ccgttatcag ttgataaac cgtggtcga gcaaatcgag  
1261 ccacagtatg ttaacagtt aagaacatta tcgggcagcc gttacgatct ggttcagcgt  
1321 aataacaata ttattctgga gtacaaaaag caggatattc ttctctgaa tattccgat  
1381 gatattaatg gtactgaaca cagtacgcag aagattcaat tgatcgtaa gagcaaatat  
1441 ggtctggatc gtatcgtctg ggatgatagt gcattacgca gtcagggcgg tcagattcag  
1501 catagcgga gccaagcgc acaagactac caggctattt tgctgctta tgtgaagg  
1561 ggcagcaata ttataaagt gaccgctgc gcctatgacc gaaatggtaa tagtttaat  
1621 aatgtacagc tcaactattc cgtttaccg aatgggcagg ttgtggacca ggttgggta  
1681 acggacttta cggctgataa gacatcggct aaagcggata acgttgatac cattacttat

1741 accgcgacgg ttaaaaagaa tgggtgtagct caggctaattg cccctgtaac atttagtatt  
 1801 gtatccggga ctgcaactct cggagcaaatt agtgccaaaa cggatggtaa cggtaggca  
 1861 accgtaacgt tgaagtcggg tacgccaggg caggctcgtcgtg tctctgctaa aaccgcggag  
 1921 atgacttcgc cacttaatgc cagtgcgggtt atattgttg atcaaaccaa ggccagcatt  
 1981 actgagatta aggctgataa aacaacagcg aaggcaaattg gttctgatgc gattacctat  
 2041 actgttaaag taatgaagaa taaccaacca gaagcaaacc attctgttac attctcaacg  
 2101 aactttggta atctgggggg gaattctaatt acccaaattg tgaaaacgga taaagatggt  
 2161 agggctacgg taaaactgac atctggcggt gcaggtaattg ctattgttag tgcaaaagtc  
 2221 agcgaagtta atacagaggt taaggctcct gaggtaaaat tcttctcagt tctgagcatt  
 2281 gatagtaattg ttaattatat tggaacctct gctactggcg ctttgcctaa tatttggttg  
 2341 caatatggtc agttcaaatt gactgctaaa ggtgggtgatg ggaaatatca atggcgctct  
 2401 caagatccaa aagttgcatc agttgatgct ttaactggtc gagttacttt gttgaagaaa  
 2461 ggaacaacaa caattgaagt tgtgtcgggt gataaccaa ctgcaacgta tacaattaat  
 2521 acacctataa aaattatatac tgtggagaca aaaaataaag tagtctataa cgatgctgaa  
 2581 gcaatatgta gaacgaataa tggccgttta ccgctatcta cgaatgagtt aaaggacgtg  
 2641 tataataaat ggggagcggc caatagttat gaaggctata aaggtaaaaa cacaataaca  
 2701 gcatggactc agcaaacaga ggatgataaa actaaagggt ggactagtagc atttgacata  
 2761 gttactaaaa atgaaatccc tagtaatgga agtaataata aggtcaatgt gacagcagct  
 2821 gcctttg ctgtctgtgt aagatga

**h) Secuencia muestra N° 39 aEPEC.**

1 atggtttcta aaatcatgaa taagaaatac gagaaaggtc tgtctttgat tgaatctgca  
61 atggtgcttg cgttgctgc aaccgttact gccggtgtga tgtttacta ccagtctgcg  
121 tctgattcca ataagtcaca gaatgctatt tcagaagtaa tgagcgcaac gtctgcaatt  
181 aatggtctgt atattgggca gaccagtat actggattga actcaaatat atagcattct  
241 gagccttccc aacatgctcg gggaaggccc attaatgacc ccgtaatcag gaattacgcg  
301 aagtcttaat accatgctct gcaagatggc ctatcagacg ctgtgctatg tccggcaatg  
361 gctgagatgc ttcatttgat accggcggcg gtggtgccgg tcggcttggc gtcagaggcg  
421 aggatgtcgt tatattccgg gctggctgaa taccatgtgc agcaagatgg tctatcagac  
481 gctgtgccac atccggaagt ggctgggctg cagaaccact acctgttgc ggctgatgaa  
541 gcgatgcaga acgggaagag cctgatacca ggggtggaatt ttgggctgta aaaagccttg  
601 ttgcgctaag ggaactattg cccggggaga aaggcgaatt aatctttatc ggggttagtg  
661 acacttttg cggtgataca gagaaactgc tgettgaac tgcagtcgct ataccacgag  
721 agactcga taacgcagaa

**i) Secuencia muestra N° 39aEPEC.**

1 atgattactc atggttttta tgcccggacc cggcacaagc ataagctaaa aaaaacattt  
61 attatgctta gtgctggttt aggattgttt tttatgtta accagaattc attgcaaac  
121 ggcgaaaatt attttaaatt gagttcagat tcaaaactgt taactcaaaa tgccgctcag  
181 gatcgctttt tttatacgtt aaaaacaggt gaaactgttg ccaatatttc taaatcacag  
241 ggtatcagtt tatcggtaat ttggtcactg aataaacatt tatacagttc cgaaagcgaa  
301 atgatgaagg ctggacctgg tcagcagatc attttccac tcaaaaaact gtctgttgaa  
361 tatagtgcct tacctgtctt aggttcggca cctgttgttg ctgcaggtgg tgtcactggt  
421 catacgaata aaatgactaa aatgtcccg gacgtgacta aaagcaacac gaccgatgac  
481 aaggctctaa attatcgggc acaacaggcc gcgagccttg gtagccagct tcagtcgcgc  
541 tcaactgaacg gcgattacgc gaaagatacc gctcttgta tggccagcag ccaggcttca  
601 tcacagttgc aggcctggtt acaacattat ggaacggcag aggttaatct gcagagcggt  
661 aataactttg acggtagttc actggacttc ttattaccgt tctatgattc cgaaaatatg  
721 ctggcatttg gtcaggtcgg ggcgcgttac attgactccc gctttacggc aaatttaggt  
781 gctggccagc gtttttct tctgaaaat atgtgggct ataactctt cattgatcag  
841 gattttctg gtgataatac ccgttaggt attggggcg aatactggcg agactatttc  
901 aaaagtagcg ttaacggcta ttccgcagtg agcggctggc atgagtcata caataagaaa  
961 gactatgatg agcgcccggc aaatggtttt gatatccgct ttaatggcta ttaccatca  
1021 tatccggcat taggcgcaa actgatgtac gaacagtatt atggtgataa tgttgctttg  
1081 ttaattccg ataagttgca gtcgaatcct ggcgcggcga ccgttggtg aaactacact  
1141 ccgattcctc tggtagcat ggggatcag taccgtcatg gtacgggtaa tgaaaatgat  
1201 ctctttact caatgcagtt ccgttatcag ttgataaac cgtggtctca gcaaatcgag  
1261 ccacagtatg ttaacgagtt aagaacatta tcgggcagcc gttacgatct ggttcagcgt  
1321 aataacaata ttattctgga gtacaaaaag caggatattc ttctctgaa tattccgat  
1381 gatattaatg gtactgaaca cagtacgcag aagattcaat tgatcgtaa gagcaaatat  
1441 ggtctggatc gtatcgtctg ggatgatagt gcattacgca gtcagggcgg tcagattcag  
1501 catagcggaa gccaaagcgc acaagactac caggctattt tgcctgctta tgtgcaaggt  
1561 ggcagcaata ttataaagt gaccgctgc gcctatgacc gaaatggtaa tagttctaat



1621 aatgtacagc tcaactattac cgttttaccg aatgggcagg ttgtggacca ggttgggta  
 1681 acggacttta cggctgataa gacatcggct aaagcggata acgttgatac cattacttat  
 1741 accgcgacgg ttaaaaagaa tgggtagct caggctaag cccctgtaac atttagtatt  
 1801 gtatccggga ctgcaactct cggagcaaat agtgccaaaa cggatggtaa cggtaggca  
 1861 accgtaacgt tgaagtcggg tacgccaggg caggctcgtg tgtctgctaa aaccgcggag  
 1921 atgacttcgc cacttaatgc cagtgcgggt atattgttg atcaaacaa ggccagcatt  
 1981 actgagatta aggctgataa aacaacagcg aaggcaaatg gttctgatgc gattacctat  
 2041 actgttaaag taatgaagaa taaccaacca gaagcaaacc attctgttac attctcaacg  
 2101 aactttgta atctgggggg gaattcta atccaaattg tgaacacgga taaagatgtt  
 2161 agggctacgg taaaactgac atctggcgtt gcaggtaatg ctattgttag tgcaaaagtc  
 2221 agcgaagtta atacagaggt taaggctcct gaggtaaaat tcttctcagt tctgagcatt  
 2281 gatagtaatg ttaatatat tggaacctct gctactggcg ctttgccaa tatttggttg  
 2341 caatatggtc agttcaaatt gactgctaaa ggtggtgatg ggaaatatca atggcgctct  
 2401 caagatcaa aagttgcatc agttgatgct ttaactggc gagttacttt gttgaagaaa  
 2461 ggaacaacaa caattgaagt tgtgtcgggt gataacaaa ctgcaacgta tacaattaat  
 2521 acacctataa aaattatata tgtggagaca aaaaataaag tagtctataa cgatgctgaa  
 2581 gcaatatgta gaacgaataa tggccgttta ccgctatcta cgaatgagtt aaaggacgtg  
 2641 tataataaat ggggagcggc caatagttat gaaggctata aaggtaaaaa cacaataaca  
 2701 gcatggactc agcaaacaga ggatgataaa actaaaggtt ggactagtag atttgacata  
 2761 gttactaaaa atgaaatccc tagtaatgga agtaataata aggtcaatgt gacagcagct  
 2821 gcctttg ctgtctgtgt aagatga

**j) Secuencia muestra N° 45 aEPEC.**

1 atgattactc atggttttta tgcccgacc cggcacaagc ataagctaaa aaaacattt  
61 attatgctta gtgctggtt aggattgtt tttatgta accagaattc atttgcaaac  
121 ggcgaaaatt attttaaatt gagttcagat tcaaaactgt taactcaaaa tgccgctcag  
181 gatgccttt ttatacgtt aaaaacaggt gaaactgtt ccaatattc taaatcacag  
241 ggtatcagtt tateggtaat ttggtcactg aataaacatt tatacagttc cgaaagcgaa  
301 atgatgaagg ctggacctgg tcagcagatc atttgccac tcaaaaaact gtctgttgaa  
361 tatagtgcct tacctgtctt aggttcggca cctgttgtt ctgcaggtgg tgcactggt  
421 catacgaata aatgactaa aatgtccccg gacgtgacta aaagcaacac gaccgatgac  
481 aaggtcttaa attatgcggc acaacaggcc gcgagcctt gtagccagct tcagtcgcgc  
541 tactgaacg gcgattacgc gaaagatacc gctcttgta tggccagcag ccaggcttca  
601 tcacagttgc aggcctggtt acaacattat ggaacggcag aggttaatct gcagagcgt  
661 aataactttg acggtagttc actggacttc ttattaccgt tctatgattc cgaaaatatg  
721 ctggcatttg gtcaggtcgg ggcgcgttac attgactccc gcttacggc aaatttaggt  
781 gctggccagc gtttttct tctgaaaat atgtgggct ataacgtctt cattgatcag  
841 gattttctg gtgataatac cgttttaggt attgggggcg aatactggcg agactatttc  
901 aaaagtagcg ttaacggcta ttccgcatg agcggctggc atgagtcata caataagaaa  
961 gactatgatg agcgcccggc aaatggttt gatatccgt ttaatggcta ttaccatca  
1021 tatccggcat taggcgcaa actgatgtac gaacagtatt atggtgataa tgttgctttg  
1081 tttaattccg ataagttgca gtcgaatcct ggcgcggcga ccgttggtgt aaactacact  
1141 ccgattcctc tggtagcat ggggatcatg taccgtcatg gtacgggtaa tgaaaatgat  
1201 ctctttact caatgcagtt ccgttatcag ttgataaac cgtggtctca gcaaatcgag  
1261 ccacagtatg ttaacagtt aagaacatta tcgggcagcc gttacgatct ggttcagcgt  
1321 aataacaata ttattctgga gtacaaaaag caggatattc ttctctgaa tattccgat  
1381 gatattaatg gtactgaaca cagtacgcag aagattcaat tgatcgtaa gagcaaatat  
1441 ggtctggatc gtatcgtctg ggatgatagt gcattacgca gtcagggcgg tcagattcag  
1501 catagcgga gccaagcgc acaagactac caggctattt tgctgctta tgtgaaggt  
1561 ggcagcaata ttataaagt gaccgctgc gcctatgacc gaaatggtaa tagttcta  
1621 aatgtacagc tcatattac cgtttaccg aatgggcagg ttgtggacca ggttgggta  
1681 acggacttta cggctgataa gacatcggct aaagcggata acgttgatac cattacttat

1741 accgcgacgg ttaaaaagaa tgggtgtagct caggctaattg cccctgtaac atttagtatt  
1801 gtatccggga ctgcaactct cggagcaaat agtgccaaaa cggatggtaa cggtaggca  
1861 accgtaacgt tgaagtcggg tacgccaggg caggctcgcg tgtctgctaa aaccgcggag  
1921 atgacttcgc cacttaatgc cagtgcgggtt atattgttg atcaaaccaa ggccagcatt  
1981 actgagatta aggctgataa aacaacagcg aaggcaaatg gttctgatgc gattacctat  
2041 actgttaaag taatgaagaa taaccaacca gaagcaaacc attctgttac atttcaacg  
2101 aactttggta atctgggggg gaattctaata acccaaattg tgaaaacgga taaagatggt  
2161 agggctacgg taaaactgac atctggcggt gcaggtaatg ctattgttag tgcaaaagtc  
2221 agcgaagtta atacagaggt taaggctcct gaggtaaaat tcttctcagt tctgagcatt  
2281 gatagtaatg ttaatatat tggaacctct gctactggcg ctttgcctaa tatttggttg  
2341 caatatggtc agttcaaatt gactgctaaa ggtgggtgat ggaaatatca atggcgctct  
2401 caagatccaa aagttgcac agttgatgct ttaactggtc gagttacttt gttgaagaaa  
2461 ggaacaacaa caattgaagt tgtgtcgggt gataaccaa ctgcaacgta tacaattaat  
2521 acacctataa aaattatatac tgtggagaca aaaaataaag tagtctataa cgatgctgaa  
2581 gcaatatgta gaacgaataa tggccgttta ccgctatcta cgaatgagtt aaaggacgtg  
2641 tataataaat ggggagcggc caatagtat gaaggctata aaggtaaaaa cacaataaca  
2701 gcatggactc agcaaacaga ggatgataaa actaaagggt ggactagtac atttgacata  
2761 gttactaaaa atgaaatccc tagtaatgga agtaataata aggtcaatgt gacagcagct  
2821gcctttg ctgtctgtgt aagatga

**k) Secuencia muestra N° 48 tEPEC.**

1 atgattactc atggttttta tgcccgacc cggcacaagc ataagctaaa aaaaacattt  
61 attatgctta gtgctgggtt aggattgtt tttatgtta accagaattc atttgcaaac  
121 ggcgaaaatt attttaaatt gagttcagat tcaaaactgt taactcaaaa tgccgctcag  
181 gatgccttt ttatacgtt aaaaacaggt gaaactgttg ccaatatttc taaatcacag  
241 ggtatcagtt tateggtaat ttggtcactg aataaacatt tatacagttc cgaaagcgaa  
301 atgatgaagg ctggacctgg tcagcagatc atttgccac tcaaaaaact gtctgttgaa  
361 tatagtgcct tacctgtctt aggttcggca cctgttgtt ctgcaggtgg tgcactggt  
421 catacgaata aatgactaa aatgtccccg gacgtgacta aaagcaacac gaccgatgac  
481 aaggtcttaa attatgcggc acaacaggcc gcgagccttg gtagccagct tcagtcgcgc  
541 tcaactgaac gcgattacgc gaaagatacc gctcttggtg tggccagcag ccaggcttca  
601 tcacagttgc aggcctgggt acaacattat ggaacggcag aggttaatct gcagagcgg  
661 aataactttg acggtagttc actggacttc ttattaccgt tctatgattc cgaaaatatg  
721 ctggcatttg gtcaggtcgg ggcgcgttac attgactccc gcttacggc aaatttaggt  
781 gctggccagc gtttttct tctgaaaat atgtgggct ataacgtctt cattgatcag  
841 gattttctg gtgataatac cgttttaggt attgggggcg aatactggcg agactatttc  
901 aaaagtagcg ttaacggcta ttccgcatg agcggctggc atgagtcata caataagaaa  
961 gactatgatg agcgcccggc aaatggttt gatatccgt ttaatggcta ttaccatca  
1021 tatccggcat taggcgcaa actgatgtac gaacagtatt atggtgataa tgttgctttg  
1081 ttaattccg ataagttgca gtcgaatcct ggcgcggcga ccgttggtgt aaactacact  
1141 ccgattcctc tggtagcat ggggatcatg taccgtcatg gtacgggtaa tgaaaatgat  
1201 ctctttact caatgcagtt ccgttatcag ttgataaac cgtggtctca gcaaatcgag  
1261 ccacagtatg ttaacagtt aagaacatta tcgggcagcc gttacgatct gggtcagcgt  
1321 aataacaata ttattctgga gtacaaaaag caggatattc ttctctgaa tattccgat  
1381 gatattaatg gtactgaaca cagtacgcag aagattcaat tgatcgtaa gagcaaata  
1441 ggtctggatc gtatcgtctg ggatgatagt gcattacgca gtcagggcgg tcagattcag  
1501 catagcgga gccaagcgc acaagactac caggctattt tgctgctta tgtgaaggt  
1561 ggcagcaata ttataaagt gaccgctgc gcctatgacc gaaatggtaa tagttcta  
1621 aatgtacagc tcaactattc cgtttaccg aatgggcagg ttgtggacca ggttggggt  
1681 acggacttta cggctgataa gacatcggct aaagcggata acgttgatac cattacttat

1741 accgcgacgg ttaaaaagaa tgggtgtagct caggctaatag cccctgtaac atttagtatt  
 1801 gtatccggga ctgcaactct cggagcaaat agtgccaaaa cggatggtaa cggttaaggca  
 1861 accgtaacgt tgaagtcggg tacgccaggg caggctcgtg tgtctgctaa aaccgcggag  
 1921 atgacttcgc cacttaatgc cagtgcgggt atattgttg atcaaacc aa ggccagcatt  
 1981 actgagatta aggctgataa aacaacagcg aaggcaaatg gttctgatgc gattacctat  
 2041 actgttaaag taatgaagaa taaccaacca gaagcaaacc attctgttac attctcaacg  
 2101 aactttggta atctgggggg gaattcta atcccaaattg tgaaaacgga taaagatgg  
 2161 agggctacgg taaaactgac atctggcggt gcaggtaatg ctattgttag tgcaaaagtc  
 2221 agcgaagtta atacagaggt taaggctcct gaggtaaaat tcttctcagt tctgagcatt  
 2281 gatagtaatg ttaatatat tggaacctct gctactggcg ctttgcctaa tatttggttg  
 2341 caatatggc agttcaaatt gactgctaaa ggtgggtgat ggaaatatca atggcgctct  
 2401 caagatccaa aagttgcatc agttgatgct ttaactggc gagttacttt gttgaagaaa  
 2461 ggaacaacaa caattgaagt tgtgtcgggt gataaccaa ctgcaacgta tacaattaat  
 2521 acacctataa aaattatata tgtggagaca aaaaataaag tagtctataa cgatgctgaa  
 2581 gcaatatgta gaacgaataa tggccgttta ccgctatcta cgaatgagtt aaaggacgtg  
 2641 tataataaat ggggagcggc caatagtat gaaggctata aaggtaaaaa cacaataaca  
 2701 gcatggactc agcaaacaga ggatgataaa actaaagggt ggactagtag atttgacata  
 2761 gttactaaaa atgaaatccc tagtaatgga agtaataata aggtcaatgt gacagcagct  
 2821 aatgcctttg ctgtctgtgt aagatga

1 atggtttcta aaatcatgaa taagaaatac gagaaaggc tgtctttgat tgaatctgca  
 61 atggtgcttg cgttgctgc aaccgttact gccggtgtga tgtttacta ccagtctgcg  
 121 tctgattcca ataagtcaca gaatgctatt tcagaagtaa tgagcgcaac gtctgcaatt  
 181 aatggtctgt atattgggca gaccagtat actggattga actcaaatat atagcattct  
 241 gagccttccc aacatgctcg gggaaggccc attaatgacc ccgtaatcag gaattacgag  
 301 aagtcttaat accatgctct gcaagatggt ctatcagacg ctgtgctatg tccggcaatg  
 361 gctgagatgc ttcatttgat accggcggcg gtggtgccgg tcggcttggc gtcagaggcg  
 421 aggatgtcgt tatattccgg gctggctgaa taccatgtgc agcaagatgg tctatcagac  
 481 gctgtgccac atccggaagt ggctgggctg cagaaccact acctgttgct ggctgatgaa  
 541 gcgatgcaga acgggaagag cctgatacca ggggtggaatt ttgggctgta aaaagccttg

601 ttgcgctaag ggaactattg cccggggaga aaggcgaatt aatctttatc ggggttagtg  
661 acactttttg cggtgataca gagaaactgc tgcttcgaac tgcagtcgct ataccacgag  
721 aaagactcga taacgcagaa

### l) Secuencia muestra N° 55 tEPEC

1 atgattactc atggttttta tgcccgacc cggcacaagc ataagctaaa aaaacattt  
61 attatgctta gtgctggtt aggattgtt tttatgta accagaattc atttgcaaac  
121 ggcgaaaatt attttaaatt gagttcagat tcaaaactgt taactcaaaa tgccgctcag  
181 gatgccttt ttatacgtt aaaaacaggt gaaactgtt ccaatattc taaatcacag  
241 ggtatcagtt tateggtaat ttggtcactg aataaacatt tatacagttc cgaaagcgaa  
301 atgatgaagg ctggacctgg tcagcagatc atttgccac tcaaaaaact gtctgttgaa  
361 tatagtgcct tacctgtctt aggttcggca cctgtgttg ctgcaggtgg tgcactggt  
421 catacgaata aatgactaa aatgtccccg gacgtgacta aaagcaacac gaccgatgac  
481 aaggtcttaa attatgcggc acaacaggcc gcgagccttg gtagccagct tcagtcgcgc  
541 tcaactgaac gcgattacgc gaaagatacc gctcttgta tggccagcag ccaggcttca  
601 tcacagttgc aggcctggtt acaacattat ggaacggcag aggttaatct gcagagcgg  
661 aataactttg acggtagttc actggacttc ttattaccgt tctatgattc cgaaaatatg  
721 ctggcatttg gtcaggtcgg ggcgcgttac attgactccc gcttacggc aaatttaggt  
781 gctggccagc gtttttct tctgaaaat atgtgggct ataacgtctt cattgatcag  
841 gattttctg gtgataatac cgttttaggt attgggggcg aatactggcg agactattc  
901 aaaagtagcg ttaacggcta ttccgcatg agcggctggc atgagtcata caataagaaa  
961 gactatgatg agcgcccgcc aatggttt gatatccgt ttaatggcta ttaccatca  
1021 tatccggcat taggcgcaa actgatgtac gaacagtatt atggtgataa tgttgcttg  
1081 tttaattccg ataagttgca gtcgaatcct ggcgcggcga ccgttggtgt aaactacact  
1141 ccgattcctc tggtagcat ggggatcatg taccgcatg gtacgggtaa tgaaaatgat  
1201 ctctttact caatgcagtt ccgttatcag ttgataaac cgtggtctca gcaaatcgag  
1261 ccacagtatg ttaacagtt aagaacatta tcgggcagcc gttacgatct gggtcagcgt  
1321 aataacaata ttattctgga gtacaaaaag caggatattc ttctctgaa tattccgat  
1381 gatattaatg gtactgaaca cagtacgcag aagattcaat tgatcgtaa gagcaaatat  
1441 ggtctggatc gtatgtctg ggatgatagt gcattacgca gtcagggcgg tcagattcag  
1501 catagcgga gccaagcgc acaagactac caggctattt tgctgctta tgtgaaggt  
1561 ggcagcaata ttataaagt gaccgctgc gcctatgacc gaaatggtaa tagttcta  
1621 aatgtacagc tcaactattc cgtttaccg aatgggcagg ttgtggacca ggttgggta  
1681 acggacttta cggctgataa gacatcggct aaagcggata acgttgatac cattacttat

1741 accgcgacgg ttaaaaagaa tgggtgtagct caggctaatag cccctgtaac atttagtatt  
 1801 gtatccggga ctgcaactct cggagcaaat agtgccaaaa cggatggtaa cggttaaggca  
 1861 accgtaacgt tgaagtcggg tacgccaggg caggctcgtc tgtctgctaa aaccgcggag  
 1921 atgacttcgc cacttaatgc cagtgcgggt atattgttg atcaaaccaa ggccagcatt  
 1981 actgagatta aggctgataa aacaacagcg aaggcaaatg gttctgatgc gattacctat  
 2041 actgttaaag taatgaagaa taaccaacca gaagcaaacc attctgttac attctcaacg  
 2101 aactttggta atctgggggg gaattctaata acccaaattg tgaaaacgga taaagatggt  
 2161 agggctacgg taaaactgac atctggcggt gcaggtaatg ctattgttag tgcaaaagtc  
 2221 agcgaagtta atacagaggt taaggctcct gaggtaaaat tcttctcagt tctgagcatt  
 2281 gatagtaatg ttaatatat tggaacctct gctactggcg ctttgcctaa tatttggttg  
 2341 caatatggtc agttcaaatt gactgctaaa ggtggtgatg ggaaatatca atggcgctct  
 2401 caagatccaa aagttgcatc agttgatgct ttaactggtc gagttacttt gttgaagaaa  
 2461 ggaacaacaa caattgaagt tgtgtcgggt gataaccaa ctgcaacgta tacaattaat  
 2521 acacctataa aaattatata tgtggagaca aaaaataaag tagtctataa cgatgctgaa  
 2581 gcaatatgta gaacgaataa tggccgttta ccgctatcta cgaatgagtt aaaggacgtg  
 2641 tataataaat ggggagcggc caatagtat gaaggctata aaggtaaaaa cacaataaca  
 2701 gcatggactc agcaaacaga ggatgataaa actaaagggt ggactagtac atttgacata  
 2761 gttactaaaa atgaaatccc tagtaatgga agtaataata aggtcaatgt gacagcagct  
 2821 aatgcctttg ctgtctgtgt aagatga

1 atggtttcta aatcatgaa taagaaatac gagaaaggtc tgtctttgat tgaatctgca  
 61 atggtgcttg cgcttgctgc aaccgttact gccggtgtga tgttttacta ccagtctgcg  
 121 tctgattcca ataagtcaca gaatgctatt tcagaagtaa tgagcgcaac gtctgcaatt  
 181 aatggtctgt atattgggca gaccagtat actggattga actcaaatat atagcattct  
 241 gagccttccc aacatgctcg gggaaggccc attaatgacc ccgtaatcag gaattacgcg  
 301 aagtcttaat accatgctct gcaagatggt ctatcagacg ctgtgctatg tccggcaatg  
 361 gctgagatgc ttcatttgat accggcggcg gtggtgccgg tcggcttggc gtcagaggcg  
 421 aggatgtcgt tatattccgg gctggctgaa taccatgtgc agcaagatgg tctatcagac  
 481 gctgtgccac atccggaagt ggctgggctg cagaaccact acctgttgcg ggctgatgaa  
 541 gcgatgcaga acgggaagag cctgatacca ggggtgaatt ttgggctgta aaaagccttg



601 ttgcgctaag ggaactattg cccggggaga aaggcgaatt aatctttatc ggggttagtg  
661 acactttttg cggtgataca gagaaactgc tgcttcgaac tgcagtcgct ataccacgag  
721 agactcga taacgcagaa

**m) Secuencia muestra N° 60 aEPEC**

1 atgattactc atggttttta tgcccgacc cggcacaagc ataagctaaa aaaaacattt  
61 attatgctta gtgctggttt aggattgttt tttatgtta accagaattc atttgcaaac  
121 ggcgaaaatt attttaaatt gagttcagat tcaaaactgt taactcaaaa tgccgctcag  
181 gatgccttt ttatacgtt aaaaacaggt gaaactgttg ccaatatttc taaatcacag  
241 ggtatcagtt tateggtaat ttggtcactg aataaacatt tatacagttc cgaaagcgaa  
301 atgatgaagg ctggacctgg tcagcagatc atttgccac tcaaaaaact gtctgttgaa  
361 tatagtgcct tacctgtctt aggttcggca cctgttgtt ctgcagggtg tgctactggt  
421 catacgaata aatgactaa aatgtccccg gacgtgacta aaagcaacac gaccgatgac  
481 aaggtcttaa attatgcggc acaacaggcc gcgagccttg gtagccagct tcagtcgcgc  
541 tcaactgaac gcgattacgc gaaagatacc gctcttggt tggccagcag ccaggcttca  
601 tcacagttgc aggcctgggt acaacattat ggaacggcag aggttaatct gcagagcgg  
661 aataactttg acggtagttc actggacttc ttattaccgt tctatgattc cgaaaatatg  
721 ctggcatttg gtcaggtcgg ggcgcgttac attgactccc gctttacggc aaatttaggt  
781 gctggccagc gtttttct tctgaaaat atgtgggct ataacgtctt cattgatcag  
841 gattttctg gtgataatac cgttttaggt attgggggcg aatactggcg agactatttc  
901 aaaagtagcg ttaacggcta ttccgcatg agcggctggc atgagtcata caataagaaa  
961 gactatgatg agcgcccggc aatggttt gatatccgt ttaatggcta ttaccatca  
1021 tatccggcat taggcgcaa actgatgtac gaacagtatt atggtgataa tgttgcttg  
1081 tttaattccg ataagttgca gtcgaatcct ggcgcggcga ccgttggtgt aaactacact  
1141 ccgattcctc tggtgacgat ggggatcgt taccgtcatg gtacgggtaa tgaaaatgat  
1201 ctctttact caatgcagtt ccgttatcag ttgataaac cgtggtctca gcaaatcgag  
1261 ccacagtatg ttaacagtt aagaacatta tcgggcagcc gttacgatct gggtcagcgt  
1321 aataacaata ttattctgga gtacaaaaag caggatattc ttctctgaa tattccgcat  
1381 gatattaatg gtactgaaca cagtacgcag aagattcaat tgatcgtaa gagcaaatat  
1441 ggtctggatc gtatcgtctg ggatgatagt gcattacgca gtcagggcgg tcagattcag  
1501 catagcgga gccaagcgc acaagactac caggctattt tgctgctta tgtgaaggt  
1561 ggcagcaata ttataaagt gaccgctgc gcctatgacc gaaatggtaa tagttcta  
1621 aatgtacagc tcaactattc cgtttaccg aatgggcagg ttgtggacca ggttggggt  
1681 acggacttta cggctgataa gacatcggct aaagcggata acgttgatac cattacttat

1741 accgcgacgg ttaaaaagaa tgggtgtagct caggctaatag cccctgtaac atttagtatt  
1801 gtatccggga ctgcaactct cggagcaaat agtgccaaaa cggatggtaa cggtaggca  
1861 accgtaacgt tgaagtcggg tacgccaggg caggctcgcg tgtctgctaa aaccgcggag  
1921 atgacttcgc cacttaatgc cagtgcgggtt atattgttg atcaaaccaa ggccagcatt  
1981 actgagatta aggctgataa aacaacagcg aaggcaaatg gttctgatgc gattacctat  
2041 actgttaaag taatgaagaa taaccaacca gaagcaaacc attctgttac attctcaacg  
2101 aactttggta atctgggggg gaattctaata acccaaattg tgaaaacgga taaagatggt  
2161 agggctacgg taaaactgac atctggcggt gcaggtaatg ctattgttag tgcaaaagtc  
2221 agcgaagtta atacagaggt taaggctcct gaggtaaaat tcttctcagt tctgagcatt  
2281 gatagtaatg ttaatatat tggaacctct gctactggcg ctttgcctaa tatttggttg  
2341 caatatggtc agttcaaatt gactgctaaa ggtgggtgat ggaaatatca atggcgctct  
2401 caagatccaa aagttgcatc agttgatgct ttaactggtc gagttacttt gttgaagaaa  
2461 ggaacaacaa caattgaagt tgtgtcgggt gataaccaa ctgcaacgta tacaattaat  
2521 acacctataa aaattatatac tgtggagaca aaaaataaag tagtctataa cgatgctgaa  
2581 gcaatatgta gaacgaataa tggccgttta ccgctatcta cgaatgagtt aaaggacgtg  
2641 tataataaat ggggagcggc caatagtat gaaggctata aaggtaaaaa cacaataaca  
2701 gcatggactc agcaaacaga ggatgataaa actaaagggt ggactagtagc atttgacata  
2761 gttactaaaa atgaaatccc tagtaatgga agtaataata aggtcaatgt gacagcagct  
2821gcctttg ctgtctgtgt aagatga

**n) Secuencia muestra N° 64 aEPEC**

1 atgattactc atggttttta tgcccgacc cggcacaagc ataagctaaa aaaaacattt  
61 attatgctta gtgctgggtt aggattgttt tttatgtta accagaattc atttgcaaac  
121 ggcgaaaatt attttaaatt gagttcagat tcaaaactgt taactcaaaa tgccgctcag  
181 gatgccttt ttatacgtt aaaaacaggt gaaactgttg ccaatatttc taaatcacag  
241 ggtatcagtt tateggtaat ttggctactg aataaacatt tatacagttc cgaaagcgaa  
301 atgatgaagg ctggacctgg tcagcagatc atttgccac tcaaaaaact gtctgttgaa  
361 tatagtgcct tacctgtctt aggttcggca cctgttgtt ctgcaggtgg tgcactggt  
421 catacgaata aatgactaa aatgtccccg gacgtgacta aaagcaacac gaccgatgac  
481 aaggtcttaa attatgcggc acaacaggcc gcgagccttg gtagccagct tcagtcgcgc  
541 tcaactgaac gcgattacgc gaaagatacc gctcttggt tggccagcag ccaggcttca  
601 tcacagttgc aggcctggtt acaacattat ggaacggcag aggttaatct gcagagcgg  
661 aataactttg acggtagttc actggacttc ttattaccgt tctatgattc cgaaaatatg  
721 ctggcatttg gtcaggtcgg ggcgcgttac attgactccc gcttacggc aaatttaggt  
781 gctggccagc gtttttct tctgaaaat atgtgggct ataacgtctt cattgatcag  
841 gattttctg gtgataatac cgttttaggt attgggggcg aatactggcg agactatttc  
901 aaaagtagcg ttaacggcta ttccgcatg agcggctggc atgagtcata caataagaaa  
961 gactatgatg agcgcccgcc aatggttt gatatccgt ttaatggcta ttaccatca  
1021 tatccggcat taggcgcaa actgatgtac gaacagtatt atggtgataa tgttgcttg  
1081 tttaattccg ataagttgca gtcgaatcct ggcgcggcga ccgttggtgt aaactacact  
1141 ccgattcctc tggtagcat ggggatcatg taccgtcatg gtacgggtaa tgaaaatgat  
1201 ctctttact caatgcagtt ccgttatcag ttgataaac cgtggtctca gcaaatcgag  
1261 ccacagtatg ttaacagtt aagaacatta tcgggcagcc gttacgatct gggtcagcgt  
1321 aataacaata ttattctgga gtacaaaaag caggatattc ttctctgaa tattccgat  
1381 gatattaatg gtactgaaca cagtacgcag aagattcaat tgatcgtaa gagcaaatat  
1441 ggtctggatc gtatcgtctg ggatgatagt gcattacgca gtcagggcgg tcagattcag  
1501 catagcgga gccaagcgc acaagactac caggctattt tgctgctta tgtgaaggt  
1561 ggcagcaata ttataaagt gaccgctgc gcctatgacc gaaatggtaa tagttcta  
1621 aatgtacagc tcaactattc cgtttaccg aatgggcagg ttgtggacca ggttgggta  
1681 acggacttta cggctgataa gacatcggct aaagcggata acgttgatac cattacttat

1741 accgcgacgg ttaaaaagaa tgggtgtagct caggctaattg cccctgtaac atttagtatt  
1801 gtatccggga ctgcaactct cggagcaaatt agtgccaaaa cggatggtaa cggttaaggca  
1861 accgtaacgt tgaagtcggg tacgccaggg caggctcgtcgtg tctctgctaa aaccgcggag  
1921 atgacttcgc cacttaatgc cagtgcgggtt atattgttg atcaaaccaa ggccagcatt  
1981 actgagatta aggctgataa aacaacagcg aaggcaaattg gttctgatgc gattacctat  
2041 actgttaaag taatgaagaa taaccaacca gaagcaaacc attctgttac attctcaacg  
2101 aactttggta atctgggggg gaattctaatt acccaaattg tgaaaacgga taaagatggt  
2161 agggctacgg taaaactgac atctggcggtt gcaggtaattg ctattgttag tgcaaaagtc  
2221 agcgaagtta atacagaggt taaggctcct gaggtaaaat tcttctcagt tctgagcatt  
2281 gatagtaattg ttaattattat tggaacctct gctactggcg ctttgcctaa tatttggttg  
2341 caatatggtc agttcaaatt gactgctaaa ggtgggtgatg ggaaatatca atggcgctct  
2401 caagatccaa aagttgcatc agttgatgct ttaactggtc gagttacttt gttgaagaaa  
2461 ggaacaacaa caattgaagt tgtgtcgggt gataaccaa ctgcaacgta tacaattaat  
2521 acacctataa aaattatatac tgtggagaca aaaaataaag tagtctataa cgatgctgaa  
2581 gcaatatgta gaacgaataa tggccgttta ccgctatcta cgaatgagtt aaaggacgtg  
2641 tataataaat ggggagcggc caatagtatt gaaggctata aaggtaaaaa cacaataaca  
2701 gcatggactc agcaaacaga ggatgataaa actaaagggtt ggactagtac atttgacata  
2761 gttactaaaa atgaaatccc tagtaatgga agtaataata aggtcaatgt gacagcagct  
2821gcctttg ctgtctgtgt aagatga

**o) Secuencia muestra N° 70 tEPEC**

1 atgattactc atggttttta tgcccgacc cggcacaagc ataagctaaa aaaaacattt  
61 attatgctta gtgctgggtt aggattgtt tttatgtta accagaattc atttgcaaac  
121 ggcgaaaatt attttaaatt gagttcagat tcaaaactgt taactcaaaa tgccgctcag  
181 gatgccttt ttatacgtt aaaaacaggt gaaactgttg ccaatatttc taaatcacag  
241 ggtatcagtt tateggtaat ttggtcactg aataaacatt tatacagttc cgaaagcgaa  
301 atgatgaagg ctggacctgg tcagcagatc atttgccac tcaaaaaact gtctgttgaa  
361 tatagtgcct tacctgtctt aggttcggca cctgttgtt ctgcaggtgg tgcactggt  
421 catacgaata aatgactaa aatgtccccg gacgtgacta aaagcaacac gaccgatgac  
481 aaggtcttaa attatgcggc acaacaggcc gcgagccttg gtagccagct tcagtcgcgc  
541 tcaactgaac gcgattacgc gaaagatacc gctcttggtg tggccagcag ccaggcttca  
601 tcacagttgc aggcctggtt acaacattat ggaacggcag aggttaatct gcagagcgg  
661 aataactttg acggtagttc actggacttc ttattaccgt tctatgattc cgaaaatatg  
721 ctggcatttg gtcaggtcgg ggcgcgttac attgactccc gctttacggc aaatttaggt  
781 gctggccagc gtttttct tctgaaaat atgtgggct ataacgtctt cattgatcag  
841 gattttctg gtgataatac cgttttaggt attgggggcg aatactggcg agactatttc  
901 aaaagtagcg ttaacggcta ttccgcatg agcggctggc atgagtcata caataagaaa  
961 gactatgatg agcgcccggc aaatggttt gatatccgt ttaatggcta ttaccatca  
1021 tatccggcat taggcgcaa actgatgtac gaacagtatt atggtgataa tgttgctttg  
1081 tttaattccg ataagttgca gtcgaatcct ggcgcggcga ccgttggtgt aaactacact  
1141 ccgattcctc tggtagcat ggggatcatg taccgtcatg gtacgggtaa tgaaaatgat  
1201 ctctttact caatgcagtt ccgttatcag ttgataaac cgtggtctca gcaaatcgag  
1261 ccacagtatg ttaacagtt aagaacatta tcgggcagcc gttacgatct gggtcagcgt  
1321 aataacaata ttattctgga gtacaaaaag caggatattc ttctctgaa tattccgat  
1381 gatattaatg gtactgaaca cagtacgcag aagattcaat tgatcgtaa gagcaaata  
1441 ggtctggatc gtatcgtctg ggatgatagt gcattacgca gtcagggcgg tcagattcag  
1501 catagcgga gccaagcgc acaagactac caggctattt tgctgctta tgtgaagg  
1561 ggcagcaata ttataaagt gaccgctgc gcctatgacc gaaatggtaa tagttcta  
1621 aatgtacagc tcaactattc cgtttaccg aatgggcagg ttgtggacca ggttgggta  
1681 acggacttta cggctgataa gacatcggct aaagcggata acgttgatac cattacttat

1741 accgcgacgg ttaaaaagaa tgggtgtagct caggctaatag cccctgtaac atttagtatt  
 1801 gtatccggga ctgcaactct cggagcaaat agtgccaaaa cggtatgtaa cggttaaggca  
 1861 accgtaacgt tgaagtcggg tacgccaggg caggctcgtc tgtctgctaa aaccgcggag  
 1921 atgacttcgc cacttaatgc cagtgcggtt atattgttg atcaaacc aa ggccagcatt  
 1981 actgagatta aggctgataa aacaacagcg aaggcaaatg gttctgatgc gattacctat  
 2041 actgttaaag taatgaagaa taaccaacca gaagcaaacc attctgttac attctcaacg  
 2101 aactttggta atctgggggg gaattcta atcccaaattg tgaaaacgga taaagatggt  
 2161 agggctacgg taaaactgac atctggcggt gcaggtaatg ctattgttag tgcaaaagtc  
 2221 agcgaagtta atacagaggt taaggctcct gaggtaaaat tcttctcagt tctgagcatt  
 2281 gatagtaatg ttaatatat tggaacctct gctactggcg cttgcctaa tatttggttg  
 2341 caatatggtc agttcaaatt gactgctaaa ggtggtgatg ggaaatatca atggcgctct  
 2401 caagatccaa aagttgcatc agttgatgct ttaactggtc gagttacttt gttgaagaaa  
 2461 ggaacaacaa caattgaagt tgtgtcgggt gataacaaa ctgcaacgta tacaattaat  
 2521 acacctataa aaattatata tgtggagaca aaaaataaag tagtctataa cgatgctgaa  
 2581 gcaatatgta gaacgaataa tggccgttta ccgctatcta cgaatgagtt aaaggacgtg  
 2641 tataataaat ggggagcggc caatagtat gaaggctata aaggtaaaaa cacaataaca  
 2701 gcatggactc agcaaacaga ggatgataaa actaaagggt ggactagtac atttgacata  
 2761 gttactaaaa atgaaatccc tagtaatgga agtaataata aggtcaatgt gacagcagct  
 2821 aatgcctttg ctgtctgtgt aagatga

1 atggtttcta aaatcatgaa taagaaatac gagaaaggtc tgtctttgat tgaatctgca  
 61 atggtgcttg cgcttgctgc aaccgttact gccggtgtga tgttttacta ccagtctgcg  
 121 tctgattcca ataagtcaca gaatgctatt tcagaagtaa tgagcgcaac gtctgcaatt  
 181 aatggtctgt atattgggca gaccagtat actggattga actcaaatat atagcattct  
 241 gagccttccc aacatgctcg gggaaggccc attaatgacc ccgtaatcag gaattacgcg  
 301 aagtcttaat accatgctct gcaagatggt ctatcagacg ctgtgctatg tccggcaatg  
 361 gctgagatgc ttcatttgat accggcggcg gtggtgccgg tcggcttggc gtcagaggcg  
 421 aggatgtcgt tatattccgg gctggctgaa taccatgtgc agcaagatgg tctatcagac  
 481 gctgtgccac atccggaagt ggctgggctg cagaaccact acctgttgcg ggctgatgaa  
 541 gcgatgcaga acgggaagag cctgatacca ggggtgaatt ttgggctgta aaaagccttg

601 ttgcgctaag ggaactattg cccggggaga aaggcgaatt aatctttatc ggggttagtg  
661 acactttttg cggtgataca gagaaactgc tgcttcgaac tgcagtcgct ataccacgag  
721 agactcga taacgcagaa



**p) Secuencia muestra N° 85 tEPEC**

1 atgattactc atggttttta tgcccgacc cggcacaagc ataagctaaa aaaaacattt  
61 attatgctta gtgctgggtt aggattgtt tttatgtta accagaattc atttgcaaac  
121 ggcgaaaatt attttaaatt gagttcagat tcaaaactgt taactcaaaa tgccgctcag  
181 gatgccttt ttatacgtt aaaaacaggt gaaactgttg ccaatatttc taaatcacag  
241 ggtatcagtt tateggtaat ttggtcactg aataaacatt tatacagttc cgaaagcgaa  
301 atgatgaagg ctggacctgg tcagcagatc atttgccac tcaaaaaact gtctgttgaa  
361 tatagtgcct tacctgtctt aggttcggca cctgttgtt ctgcaggtgg tgcactggt  
421 catacgaata aatgactaa aatgtccccg gacgtgacta aaagcaacac gaccgatgac  
481 aaggtcttaa attatgcggc acaacaggcc gcgagccttg gtagccagct tcagtcgcgc  
541 tcaactgaac gcgattacgc gaaagatacc gctcttggtg tggccagcag ccaggcttca  
601 tcacagttgc aggcctggtt acaacattat ggaacggcag aggttaatct gcagagcgg  
661 aataactttg acggtagttc actggacttc ttattaccgt tctatgattc cgaaaatatg  
721 ctggcatttg gtcaggtcgg ggcgcgttac attgactccc gcttacggc aaatttaggt  
781 gctggccagc gtttttct tctgaaaat atgtgggct ataacgtctt cattgatcag  
841 gattttctg gtgataatac cgttttaggt attgggggcg aatactggcg agactatttc  
901 aaaagtagcg ttaacggcta ttccgcatg agcggctggc atgagtcata caataagaaa  
961 gactatgatg agcgcccgcc aatggttt gatatccgt ttaatggcta ttaccatca  
1021 tatccggcat taggcgcaa actgatgtac gaacagtatt atggtgataa tgttgcttg  
1081 tttaattccg ataagttgca gtcgaatcct ggcgcggcga ccgttggtgt aaactacact  
1141 ccgattcctc tggtagcat ggggatcatg taccgtcatg gtacgggtaa tgaaaatgat  
1201 ctctttact caatgcagtt ccgttatcag ttgataaac cgtggtctca gcaaatcgag  
1261 ccacagtatg ttaacagtt aagaacatta tcgggcagcc gttacgatct gggtcagcgt  
1321 aataacaata ttattctgga gtacaaaaag caggatattc ttctctgaa tattccgat  
1381 gatattaatg gtactgaaca cagtacgcag aagattcaat tgatcgtaa gagcaaatat  
1441 ggtctggatc gtatcgtctg ggatgatagt gcattacgca gtcagggcgg tcagattcag  
1501 catagcgga gccaagcgc acaagactac caggctattt tgctgctta tgtgaagg  
1561 ggcagcaata ttataaagt gaccgctgc gcctatgacc gaaatggtaa tagttcta  
1621 aatgtacagc tcaactattc cgtttaccg aatgggcagg ttgtggacca ggttgggta  
1681 acggacttta cggctgataa gacatcggct aaagcggata acgttgatac cattacttat

1741 accgcgacgg ttaaaaagaa tgggtgtagct caggctaatag cccctgtaac atttagtatt  
 1801 gtatccggga ctgcaactct cggagcaaat agtgccaaaa cggatggtaa cggttaaggca  
 1861 accgtaacgt tgaagtcggg tacgccaggg caggctcgtg tgtctgctaa aaccgcggag  
 1921 atgacttcgc cacttaatgc cagtgcggtt atattgttg atcaaaccaa ggccagcatt  
 1981 actgagatta aggctgataa aacaacagcg aaggcaaatg gttctgatgc gattacctat  
 2041 actgttaaag taatgaagaa taaccaacca gaagcaaacc attctgttac attctcaacg  
 2101 aactttggta atctgggggg gaattctaata acccaaattg tgaaaacgga taaagatggt  
 2161 agggctacgg taaaactgac atctggcggt gcaggtaatg ctattgttag tgcaaaagtc  
 2221 agcgaagtta atacagaggt taaggctcct gaggtaaaat tcttctcagt tctgagcatt  
 2281 gatagtaatg ttaatatat tggaacctct gctactggcg cttgcctaa tatttggttg  
 2341 caatatggtc agttcaaatt gactgctaaa ggtggtgatg ggaaatatca atggcgctct  
 2401 caagatccaa aagttgcatc agttgatgct ttaactggtc gagttacttt gttgaagaaa  
 2461 ggaacaacaa caattgaagt tgtgtcgggt gataaccaa ctgcaacgta tacaattaat  
 2521 acacctataa aaattatatac tgtggagaca aaaaataaag tagtctataa cgatgctgaa  
 2581 gcaatatgta gaacgaataa tggccgttta ccgctatcta cgaatgagtt aaaggacgtg  
 2641 tataataaat ggggagcggc caatagtat gaaggctata aaggtaaaaa cacaataaca  
 2701 gcatggactc agcaaacaga ggatgataaa actaaagggt ggactagtac atttgacata  
 2761 gttactaaaa atgaaatccc tagtaatgga agtaataata aggtcaatgt gacagcagct  
 2821 aatgcctttg ctgtctgtgt aagatga

1 atggtttcta aatcatgaa taagaaatac gagaaaggtc tgtctttgat tgaatctgca  
 61 atggtgcttg cgttctgctc aaccgttact gccggtgtga tgttttacta ccagtctgcg  
 121 tctgattcca ataagtcaca gaatgctatt tcagaagtaa tgagcgcaac gtctgcaatt  
 181 aatggtctgt atattggga gaccagtat actggattga actcaaatat atagcattct  
 241 gagccttccc aacatgctcg gggaaggccc attaataacc ccgtaatcag gaattacgcg  
 301 aagtcttaat accatgctct gcaagatggt ctatcagacg ctgtgctatg tccggcaatg  
 361 gctgagatgc ttcatttgat accggcggcg gtggtgccgg tcggcttggc gtcagaggcg  
 421 aggatgtcgt tatattccgg gctggctgaa taccatgtgc agcaagatgg tctatcagac  
 481 gctgtgccac atccggaagt ggctgggctg cagaaccact acctgttctt ggctgatgaa  
 541 gcgatgcaga acgggaagag cctgatacca ggggtgaatt ttgggctgta aaaagccttg

601 ttgcgctaag ggaactattg cccggggaga aaggcgaatt aatctttatc ggggttagtg  
661 acactttttg cggtgataca gagaaactgc tgcttcgaac tgcagtcgct ataccacgag  
721 agactcga taacgcagaa

**q) Secuencia muestra N° 86 aEPEC.**

1 atgattactc atggttttta tgcccgacc cggcacaagc ataagctaaa aaaacattt  
61 attatgctta gtgctggttt aggattgtt tttatgtta accagaattc atttgcaaac  
121 ggcgaaaatt attttaaatt gagttcagat tcaaaactgt taactcaaaa tgccgctcag  
181 gatgccttt ttatacgtt aaaaacaggt gaaactgttg ccaatatttc taaatcacag  
241 ggtatcagtt tateggtaat ttggtcactg aataaacatt tatacagttc cgaaagcgaa  
301 atgatgaagg ctggacctgg tcagcagatc atttgccac tcaaaaaact gtctgttgaa  
361 tatagtgcct tacctgtctt aggttcggca cctgtgttg ctgcaggtgg tgcactggt  
421 catacgaata aatgactaa aatgtccccg gacgtgacta aaagcaacac gaccgatgac  
481 aaggtcttaa attatgcggc acaacaggcc gcgagccttg gtagccagct tcagtcgcgc  
541 tcaactgaacg gcgattacgc gaaagatacc gctcttggtg tggccagcag ccaggcttca  
601 tcacagttgc aggcctggtt acaacattat ggaacggcag aggttaatct gcagagcgg  
661 aataactttg acggtagttc actggacttc ttattaccgt tctatgattc cgaaaatatg  
721 ctggcatttg gtcaggtcgg ggcgcgttac attgactccc gcttacggc aaatttaggt  
781 gctggccagc gtttttct tctgaaaat atgtgggct ataacgtctt cattgatcag  
841 gattttctg gtgataatac cgttttaggt attgggggcg aatactggcg agactatttc  
901 aaaagtagcg ttaacggcta ttccgcatg agcggctggc atgagtcata caataagaaa  
961 gactatgatg agcgcccgcc aatggttt gatatccgt ttaatggcta ttaccatca  
1021 tatccggcat taggcgcaa actgatgtac gaacagtatt atggtgataa tgttgcttg  
1081 tttaattccg ataagttgca gtcgaatcct ggcgcgccga ccgttggtgt aaactacact  
1141 ccgattcctc tggtgacgat ggggatcgt taccgtcatg gtacgggtaa tgaaaatgat  
1201 ctctttact caatgcagtt ccgttatcag ttgataaac cgtggtctca gcaaatcgag  
1261 ccacagtatg ttaacagtt aagaacatta tcgggcagcc gttacgatct gggtcagcgt  
1321 aataacaata ttattctgga gtacaaaaag caggatattc ttctctgaa tattccgcat  
1381 gatattaatg gtactgaaca cagtacgcag aagattcaat tgatcgtaa gagcaaatat  
1441 ggtctggatc gtatcgtctg ggatgatagt gcattacgca gtcagggcgg tcagattcag  
1501 catagcgga gccaagcgc acaagactac caggctattt tgctgctta tgtgcaaggt  
1561 ggcagcaata ttataaagt gaccgctgc gcctatgacc gaaatggtaa tagttcta  
1621 aatgtacagc tcaactattc cgtttaccg aatgggcagg ttgtggacca ggttggggt  
1681 acggacttta cggctgataa gacatcggct aaagcggata acgttgatac cattacttat

1741 accgcgacgg ttaaaaagaa tgggtgtagct caggctaattg cccctgtaac atttagtatt  
 1801 gtatccggga ctgcaactct cggagcaaatt agtgccaaaa cggatggtaa cggtaggca  
 1861 accgtaacgt tgaagtcggg tacgccaggg caggctcgcg tgtctgctaa aaccgcggag  
 1921 atgacttcgc cacttaatgc cagtgcggtt atattgttg atcaaaccaa ggccagcatt  
 1981 actgagatta aggctgataa aacaacagcg aaggcaaattg gttctgatgc gattacctat  
 2041 actgttaaag taatgaagaa taaccaacca gaagcaaacc attctgttac atttcaacg  
 2101 aactttggta atctgggggg gaattctaatt acccaaattg tgaaaacgga taaagatggt  
 2161 agggctacgg taaaactgac atctggcggt gcaggtaattg ctattgttag tgcaaaagtc  
 2221 agcgaagtta atacagaggt taaggctcct gaggtaaaat tcttctcagt tctgagcatt  
 2281 gatagtaattg ttaattatat tggaacctct gctactggcg ctttgcctaa tatttggttg  
 2341 caatatggtc agttcaaatt gactgctaaa ggtgggtgat ggaaatatca atggcgctct  
 2401 caagatccaa aagttgcatc agttgatgct ttaactggtc gagttacttt gttgaagaaa  
 2461 ggaacaacaa caattgaagt tgtgtcgggt gataaccaa ctgcaacgta tacaattaat  
 2521 acacctataa aaattatatc tgtggagaca aaaaataaag tagtctataa cgatgctgaa  
 2581 gcaatatgta gaacgaataa tggccgttta ccgctatcta cgaatgagtt aaaggacgtg  
 2641 tataataaat ggggagcggc caatagtatt gaaggctata aaggtaaaaa cacaataaca  
 2701 gcatggactc agcaaacaga ggatgataaa actaaagggt ggactagtac atttgacata  
 2761 gttactaaaa atgaaatccc tagtaatgga agtaataata aggtcaatgt gacagcagct  
 2821gcctttg ctgtctgtgt aagatga

**r) Secuencia muestra N° 89 aEPEC**

1 atgattactc atggttttta tgcccgacc cggcacaagc ataagctaaa aaaaacattt  
61 attatgetta gtgctggtt aggattgtt tttatgtta accagaattc atttgcaaac  
121 ggcgaaaatt attttaatt gagttcagat tcaaaactgt taactcaaaa tgccgctcag  
181 gatcgcttt tttatacgtt aaaaacaggt gaaactgtg ccaatatttc taaatcacag  
241 ggtatcagtt tatecgtaat ttggtcactg aataaacatt tatacagttc cgaaagcgaa  
301 atgatgaagg ctggacctgg tcagcagatc atttgccac tcaaaaaact gtctgttgaa  
361 tatagtgcct tacctgtctt aggttcggca cctgtgttg ctgcaggtgg tgcactggt  
421 catacgaata aatgactaa aatgtcccg gacgtgacta aaagcaacac gaccgatgac  
481 aaggctctaa attatgcggc acaacaggcc gcgagcctg gtagccagct tcagtcgcg  
541 tcaactgaacg gcgattacgc gaaagatacc gctcttgta tggccagcag ccaggcttca  
601 tcacagttgc aggcctggtt acaacattat ggaacggcag aggttaatct gcagagcggt  
661 aataactttg acggtagttc actggacttc ttattaccgt tctatgattc cgaaaatatg  
721 ctggcatttg gtcaggtcgg ggcgcgttac attgactccc gctttacggc aaatttaggt  
781 gctggccagc gtttttct tctgaaaat atgttgggt ataactctt cattgatcag  
841 gattttctg gtgataatac ccgttaggt attggggcg aatactggcg agactatttc  
901 aaaagtagcg ttaacggcta ttccgcagtg agcggctggc atgagtcata caataagaaa  
961 gactatgatg agcgcccggc aatgggttt gatatccgt ttaatggcta ttaccatca  
1021 tatccggcat tagcgccaa actgatgtac gaacagtatt atggtgataa tgttgctttg  
1081 ttaattccg ataagttgca gtcgaatct ggcgcggcga ccgttggtgt aaactacact  
1141 ccgattcctc tggtagcat ggggatcatg taccgtcatg gtacgggtaa tgaaaatgat  
1201 ctctttact caatgcagtt ccgttatcag ttgataaac cgtggtctca gcaaatcgag  
1261 ccacagtatg ttaacagtt aagaacatta tcgggcagcc gttacgatct ggttcagcgt  
1321 aataacaata ttattctgga gtacaaaaag caggatattc ttctctgaa tattccgat  
1381 gatattaatg gtactgaaca cagtacgcag aagattcaat tgatcgtaa gagcaaatat  
1441 ggtctggatc gtatgcttg ggatgatagt gcattacgca gtcagggcgg tcagattcag  
1501 catagcgga gccaagcgc acaagactac caggctattt tgcctgctta tgtgcaaggt  
1561 ggcagcaata ttataaagt gaccgctgc gcctatgacc gaaatggtaa tagttcta  
1621 aatgtacagc tcaactattc cgtttaccg aatgggcagg ttgtggacca ggttgggta

1681 acggacttta cggctgataa gacatcggct aaagcggata acgttgatac cattacttat  
 1741 accgcgacgg ttaaaaagaa tgggtgtagct caggctaatag ccctgtaac atttagtatt  
 1801 gtatccggga ctgcaactct cggagcaaat agtgccaaaa cggatggtaa cggttaaggca  
 1861 accgtaacgt tgaagtcggg tacgccaggg caggctcgtg tgtctgctaa aaccgcggag  
 1921 atgacttcgc cacttaatgc cagtgcgggt atattgttg atcaaacca ggccagcatt  
 1981 actgagatta aggctgataa aacaacagcg aaggcaaatg gttctgatgc gattacctat  
 2041 actgttaaag taatgaagaa taaccaacca gaagcaaacc attctgttac attctcaacg  
 2101 aactttggta atctgggggg gaattctaata acccaaattg tgaacacgga taaagatggt  
 2161 agggctacgg taaaactgac atctggcggt gcaggtaatg ctattgttag tgcaaacgac  
 2221 agcgaagtta atacagaggt taaggctcct gaggtaaaat tcttctcagt tctgagcatt  
 2281 gatagtaatg ttaatatat tggaacctct gctactggcg ctttgcctaa tatttggttg  
 2341 caatatggtc agttcaaatt gactgctaaa ggtgggtgat ggaaatatca atggcgctct  
 2401 caagatccaa aagttgcac agttgatgct ttaactggc gagttactt gttgaagaaa  
 2461 ggaacaacaa caattgaagt tgtgtcgggt gataacaaa ctgcaacgta tacaattaat  
 2521 acacctataa aaattatatac tgtggagaca aaaaataaag tagtctataa cgatgctgaa  
 2581 gcaatatgta gaacgaataa tggccgttta ccgctatcta cgaatgagtt aaaggacgtg  
 2641 tataataaat ggggagcggc caatagtat gaaggctata aaggtaaaaa cacaataaca  
 2701 gcatggactc agcaaacaga ggatgataaa actaaagggt ggactagtagc atttgacata  
 2761 gttactaaaa atgaaatccc tagtaatgga agtaataata aggtcaatgt gacagcagct  
 2821 gcctttg ctgtctgtgt aagatga

**s) Secuencia muestra N° 93 aEPEC**

1 atgattactc atggttttta tgcccggacc cggcacaagc ataagctaaa aaaaacattt  
61 attatgctta gtgctgggtt aggattgttt tttatgtta accagaattc atttgcaaac  
121 ggcgaaaatt attttaaatt gagttcagat tcaaaactgt taactcaaaa tgccgctcag  
181 gatgccttt ttatacgtt aaaaacaggt gaaactgttg ccaatatttc taaatcacag  
241 ggtatcagtt tateggtaat ttggtcactg aataaacatt tatacagttc cgaaagcgaa  
301 atgatgaagg ctggacctgg tcagcagatc atttgccac tcaaaaaact gtctgttgaa  
361 tatagtgcct tacctgtctt aggttcggca cctgttgtt ctgcagggtg tgctactggt  
421 catacgaata aatgactaa aatgtccccg gacgtgacta aaagcaacac gaccgatgac  
481 aaggtcttaa attatgcggc acaacaggcc gcgagccttg gtagccagct tcagtcgcgc  
541 tcaactgaac gcgattacgc gaaagatacc gctcttggtg tggccagcag ccaggcttca  
601 tcacagttgc aggcctgggt acaacattat ggaacggcag aggttaatct gcagagcgg  
661 aataactttg acggtagttc actggacttc ttattaccgt tctatgattc cgaaaatatg  
721 ctggcatttg gtcaggtcgg ggcgcgttac attgactccc gctttacggc aaatttaggt  
781 gctggccagc gtttttct tctgaaaat atgtgggct ataacgtctt cattgatcag  
841 gattttctg gtgataatac cgttttaggt attgggggcg aatactggcg agactatttc  
901 aaaagtagcg ttaacggcta ttccgcatg agcggctggc atgagtcata caataagaaa  
961 gactatgatg agcgcccggc aaatggttt gatatccgt ttaatggcta ttaccatca  
1021 tatccggcat taggcgcaa actgatgtac gaacagtatt atggtgataa tgttgctttg  
1081 tttaattccg ataagttgca gtcgaatcct ggcgcggcga ccgttggtgt aaactacact  
1141 ccgattcctc tggtgacgat ggggatcgt taccgtcatg gtacgggtaa tgaaaatgat  
1201 ctctttact caatgcagtt ccgttatcag ttgataaac cgtggtctca gcaaatcgag  
1261 ccacagtatg ttaacagtt aagaacatta tcgggcagcc gttacgatct gggtcagcgt  
1321 aataacaata ttattctgga gtacaaaaag caggatattc ttctctgaa tattccgcat  
1381 gatattaatg gtactgaaca cagtacgcag aagattcaat tgatcgtaa gagcaaatat  
1441 ggtctggatc gtatcgtctg ggatgatagt gcattacgca gtcagggcgg tcagattcag  
1501 catagcgga gccaagcgc acaagactac caggctattt tgctgctta tgtgaaggt  
1561 ggcagcaata ttataaagt gaccgctcgc gcctatgacc gaaatggtaa tagttcta  
1621 aatgtacagc tcaactattac cgttttaccg aatgggcagg ttgtggacca ggttggggt  
1681 acggacttta cggctgataa gacatcggct aaagcggata acgttgatac cattacttat



1741 accgcgacgg ttaaaaagaa tgggtgtagct caggctaattg cccctgtaac atttagtatt  
1801 gtatccggga ctgcaactct cggagcaaatt agtgccaaaa cggatggtaa cggtaggca  
1861 accgtaacgt tgaagtcggg tacgccaggg caggctcgcg tgtctgctaa aaccgcggag  
1921 atgacttcgc cacttaatgc cagtgcggtt atattgttg atcaaaccaa ggccagcatt  
1981 actgagatta aggctgataa aacaacagcg aaggcaaattg gttctgatgc gattacctat  
2041 actgttaaag taatgaagaa taaccaacca gaagcaaacc attctgttac atttcaacg  
2101 aactttggta atctgggggg gaattctaatt acccaaattg tgaaaacgga taaagatggt  
2161 agggctacgg taaaactgac atctggcggt gcaggtaattg ctattgttag tgcaaaagtc  
2221 agcgaagtta atacagaggt taaggctcct gaggtaaaat tcttctcagt tctgagcatt  
2281 gatagtaattg ttaattatat tggaacctct gctactggcg ctttgcctaa tatttggttg  
2341 caatatggtc agttcaaatt gactgctaaa ggtgggtgat ggaaatatca atggcgctct  
2401 caagatccaa aagttgcatc agttgatgct ttaactggtc gagttacttt gttgaagaaa  
2461 ggaacaacaa caattgaagt tgtgtcgggt gataaccaa ctgcaacgta tacaattaat  
2521 acacctataa aaattatatac tgtggagaca aaaaataaag tagtctataa cgatgctgaa  
2581 gcaatatgta gaacgaataa tggccgttta ccgctatcta cgaatgagtt aaaggacgtg  
2641 tataataaat ggggagcggc caatagtatt gaaggctata aaggtaaaaa cacaataaca  
2701 gcatggactc agcaaacaga ggatgataaa actaaagggt ggactagtac atttgacata  
2761 gttactaaaa atgaaatccc tagtaatgga agtaataata aggtcaatgt gacagcagct  
2821 aatgcctttg ctgtctgtgt aagatga

**Anexo No 5.** Procedimiento de aislamiento y extracción de ADN y electroforesis de los especímenes amplificados.



a) Cajas Petri con muestras luego de repique e incubación de 24 horas

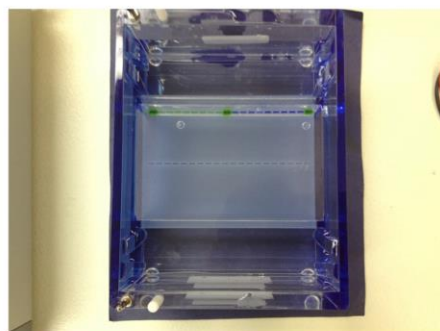


b) Kit de extracción de DNA.

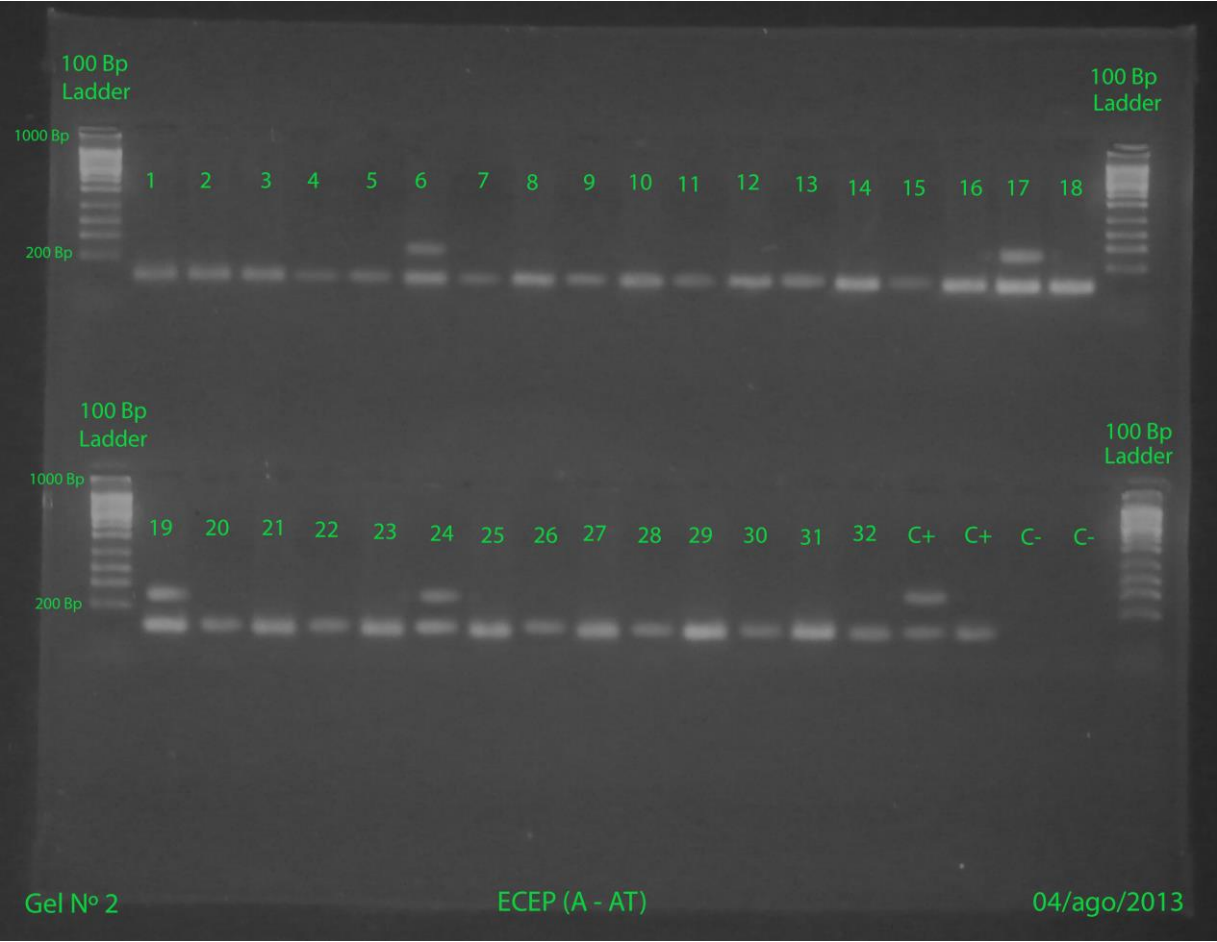
c) Proceso de extracción de DNA culminado.s



d) Proceso de electroforesis.



**Anexo No 6:**Revelado del gel luego del proceso de estandarización de la técnica de PCR.



## **Anexo No 7: Protocolo de extracción y purificación de ADN**

1. Cada una de las muestras fueron centrifugadas a 15,000 rpm por gramo de fuerza en una totalidad de 5 minutos, (a pesar que el prospecto indica que se la centrifugación debe ser de dos minutos se dieron mejores resultados con este tiempo) y se retira el sobrenadante colocándose en un Eppendorff nuevo.
2. Agregar 600µl de la solución de lisis nuclear y se da una homogeneización correcta a la mezcla.
3. Incubar a 80°C por 10 minutos, para lograr la correcta lisis bacteriana, tras esto se espera a que las muestras vuelvan a la temperatura ambiente para seguir con el procedimiento.
4. Añadir 3µl de la solución “RNase” a la mezcla de bacterias lisadas, asegurándose que todas las RNasas que se encuentran en la solución sean denaturalizadas y por tanto no afecten al producto final, se mezcla la muestra de de 10 a 15.
5. Incubar por 20 minutos cada una de las muestras a 37°C, para que luego regrese a la temperatura ambiente.
6. A la solución libre de RNasas añadimos 200µl de “Protein Precipitation Solution” y a continuación agitar vigorosamente con un vortex por un minuto cada una de las muestras, y colocarlas en hielo por 5 minutos.
7. Luego de la incubación centrifugamos a 15,000 Rpm por gramo de fuerza / 5 minutos.
8. Transferimos el sobrenadante resultante a un Eppendorff que contenga 600µl de isopropanol a temperatura ambiente; y mezclamos suavemente hasta observar varias cadenas formadas por el DNA en la solución.
9. Centrifugamos una vez más a 15,000 RPM por gramo por 3 minutos, y absorbemos el sobrenadante; seguidamente se coloca los Eppendorff sobre papeles absorbentes. Al estar secos cada uno de estos.

10. Añadir 600µl con etanol al 70% y se mezcla 15 veces cada uno de los Eppendorff, se centrifuga por última vez a 15,000 Rpm por gramo por 3 minutos y se aspira el etanol.
11. Dejar secar a cada uno de las muestras por 20 minutos a temperatura ambiente para que se evapore todo el etanol de los Eppendorff y se agregan 100µl de solución rehidratante.
12. Se incuba esta solución a 65°C por una hora.

**Anexo No 8:** Tablas de cuantificación de ADN de cada una de las muestras.

<b>Muestras Laboratorio 1</b>				
<b>ID Muestra</b>	<b>Concentración DNA</b>	<b>Unidad</b>	<b>260/280</b>	<b>260/230</b>
1	51,5	ng/μl	1,87	1,65
2	52,1	ng/μl	1,9	2,17
3	53,8	ng/μl	1,91	2,15
4	52,4	ng/μl	1,89	2,05
5	51,7	ng/μl	1,88	1,93
6	52,4	ng/μl	1,85	1,74
7	53,2	ng/μl	1,81	1,61
8	57,5	ng/μl	1,82	1,11
9	75,8	ng/μl	1,87	1,69
10	75,8	ng/μl	1,87	1,72
11	73,6	ng/μl	1,91	1,76
12	75,4	ng/μl	1,9	1,68
13	75,3	ng/μl	1,86	1,62
14	74,8	ng/μl	1,86	1,59
15	75,5	ng/μl	1,88	1,56
16	75,8	ng/μl	1,88	1,56
17	75,1	ng/μl	1,88	1,55
18	76,4	ng/μl	1,89	1,51
21	79,2	ng/μl	1,86	1,36
22	79,9	ng/μl	1,86	1,36
23	80,5	ng/μl	1,9	1,33
24	81,2	ng/μl	1,86	1,32
25	51,5	ng/μl	1,87	1,65
26	52,3	ng/μl	1,9	2,17
27	52	ng/μl	1,91	2,15
28	52,7	ng/μl	1,89	2,05
29	52,7	ng/μl	1,88	1,93
30	51,9	ng/μl	1,85	1,74
31	53,7	ng/μl	1,81	1,61
32	57,1	ng/μl	1,82	1,11
33	75,8	ng/μl	1,87	1,69
35	73,6	ng/μl	1,91	1,76
36	75,4	ng/μl	1,9	1,68
37	75,3	ng/μl	1,86	1,62
39	75,5	ng/μl	1,88	1,56
41	75,1	ng/μl	1,88	1,55
42	76,4	ng/μl	1,89	1,51

<b>Muestras Laboratorio 2</b>				
<b>ID Muestra</b>	<b>Concentración DNA</b>	<b>Unidad</b>	<b>260/280</b>	<b>260/230</b>
43	79,9	ng/μl	1,89	1,51
44	60,1	ng/μl	1,88	1,83
45	48,8	ng/μl	1,83	2,18
46	45,7	ng/μl	1,92	1,6
47	42,2	ng/μl	1,85	1,24
48	52,1	ng/μl	1,79	1,3
49	71,5	ng/μl	1,8	1,33

<b>Muestras Laboratorio 3</b>				
<b>ID Muestra</b>	<b>Concentración DNA</b>	<b>Unidad</b>	<b>260/280</b>	<b>260/230</b>
50	64,9	ng/μl	1,8	1,33
51	62,1	ng/μl	1,92	1,93
52	75,4	ng/μl	1,9	1,68
53	75,3	ng/μl	1,86	1,62
54	45,7	ng/μl	1,92	1,6
55	75,1	ng/μl	1,88	1,55
56	76,4	ng/μl	1,89	1,51
57	73,6	ng/μl	1,91	1,76
58	55,7	ng/μl	1,77	1,8
59	52,1	ng/μl	1,8	1,73

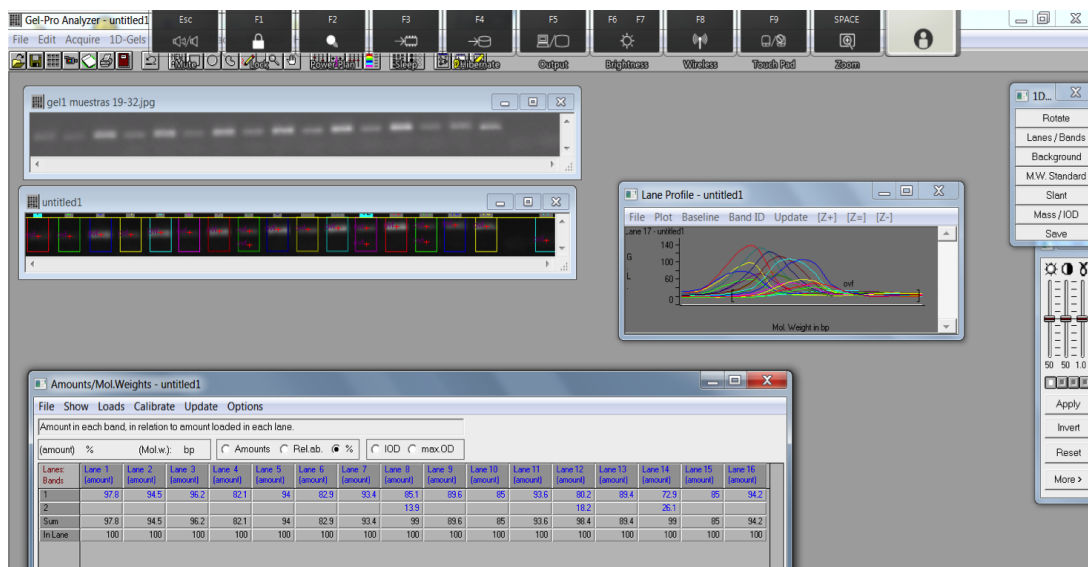
<b>Muestras laboratorio 4</b>				
<b>ID Muestra</b>	<b>Concentración DNA</b>	<b>Unidad</b>	<b>260/280</b>	<b>260/230</b>
60	55,8	ng/μl	1,89	1,51
61	52,7	ng/μl	1,88	1,83
62	48,9	ng/μl	1,83	2,18
63	55,7	ng/μl	1,92	1,6
64	54,7	ng/μl	1,85	1,24
65	54,9	ng/μl	1,79	1,3
66	64,9	ng/μl	1,8	1,33
67	62,1	ng/μl	1,92	1,93
68	57,8	ng/μl	1,71	1,32
69	73,2	ng/μl	1,81	1,42
70	98,5	ng/μl	1,78	1,23
71	61,1	ng/μl	1,76	1,79
72	75,3	ng/μl	1,81	1,02
73	53,8	ng/μl	2,07	2,08
74	72,1	ng/μl	1,45	11,14

75	73,9	ng/μl	1,75	0,94
76	73,2	ng/μl	1,8	1,82
77	72,1	ng/μl	1,78	1,29
78	58,7	ng/μl	1,73	1,08
79	65,9	ng/μl	1,76	2,85
80	60,1	ng/μl	1,32	2,08
81	56,4	ng/μl	1,28	1,43
82	64,9	ng/μl	1,47	1,12
83	57,8	ng/μl	1,64	1,69
84	49,6	ng/μl	1,42	1,18
85	55,7	ng/μl	1,77	1,8
86	58,7	ng/μl	1,82	1,83
87	61,1	ng/μl	1,45	1,84
88	33,8	ng/μl	1,79	1,37
89	52,1	ng/μl	1,8	1,73
90	50,7	ng/μl	1,68	1,33
91	52,7	ng/μl	1,73	1,33
92	53,9	ng/μl	1,47	1,93
93	53	ng/μl	1,82	1,32
94	64,7	ng/μl	1,47	2,08

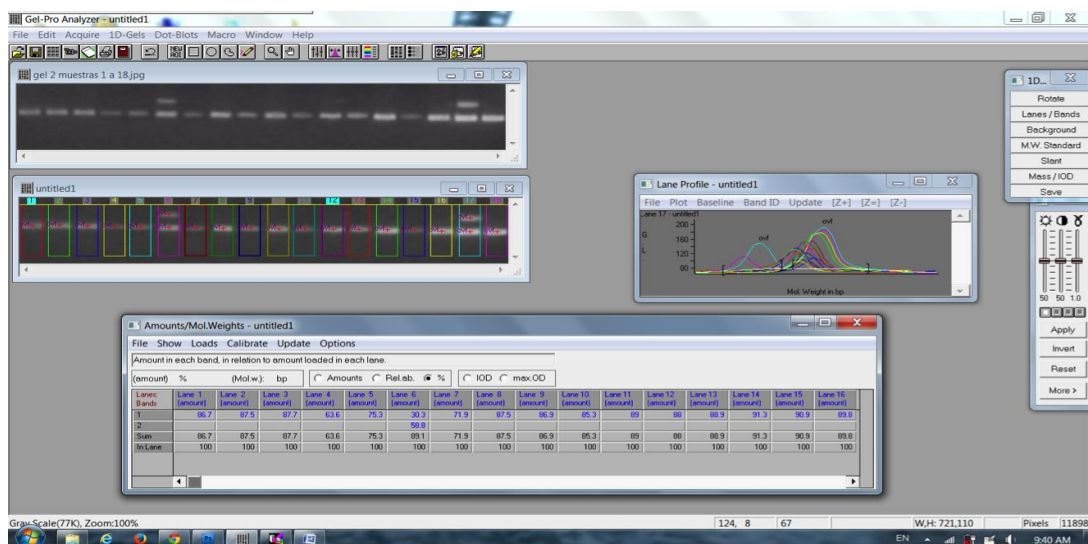


## Anexo No 9: Análisis Gelpro.

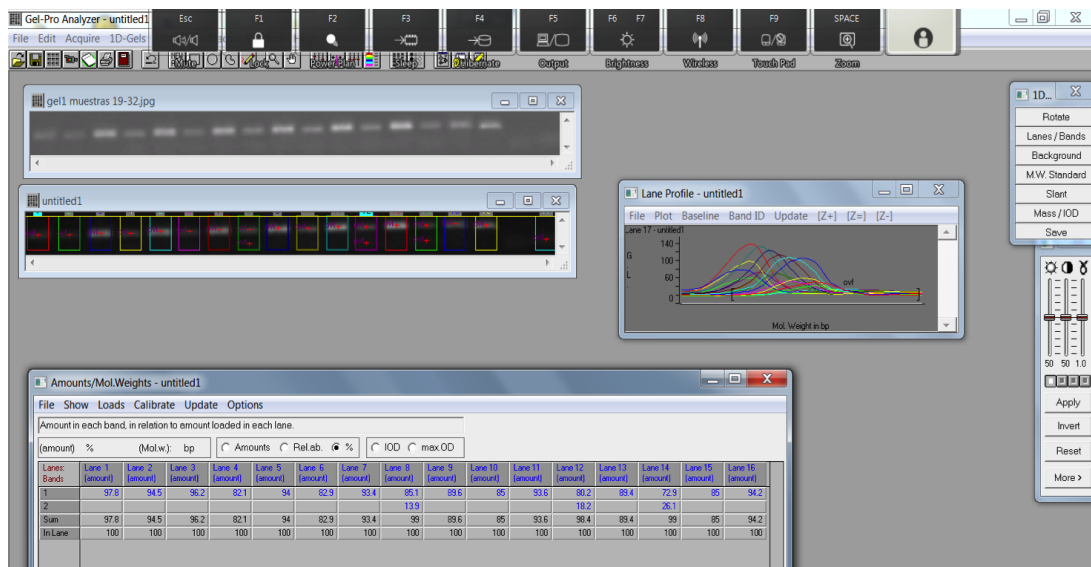
### a) Análisis de muestras 1 a 18



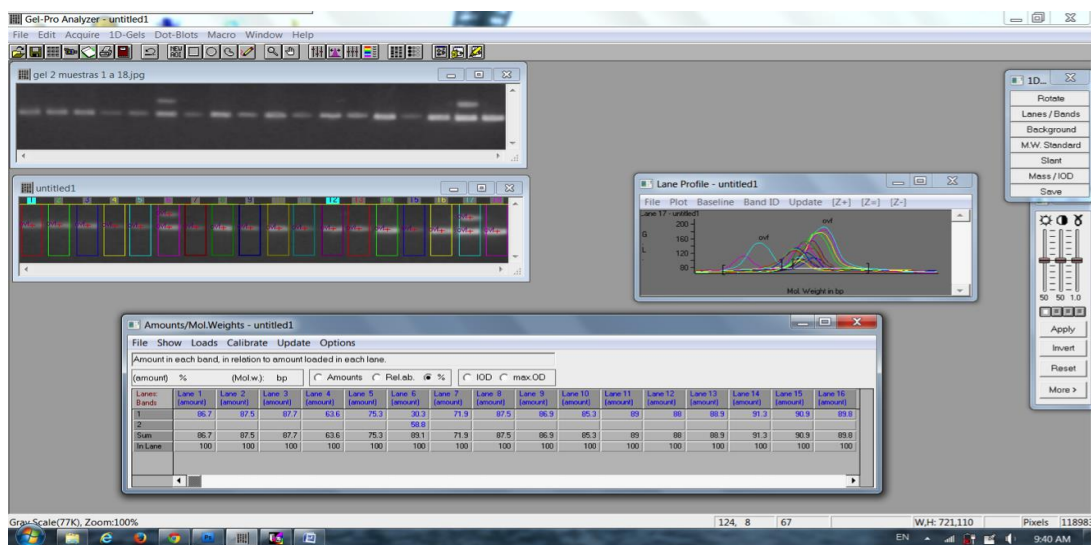
### b) Análisis de muestras 19 a 32



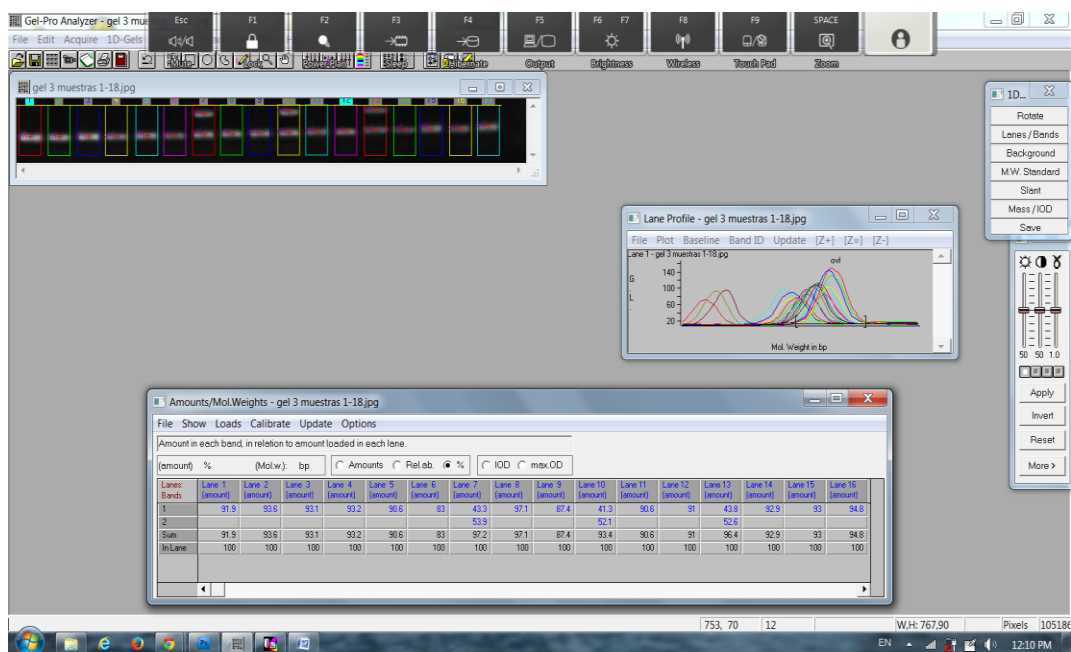
### c) Análisis de muestras 33 a 49



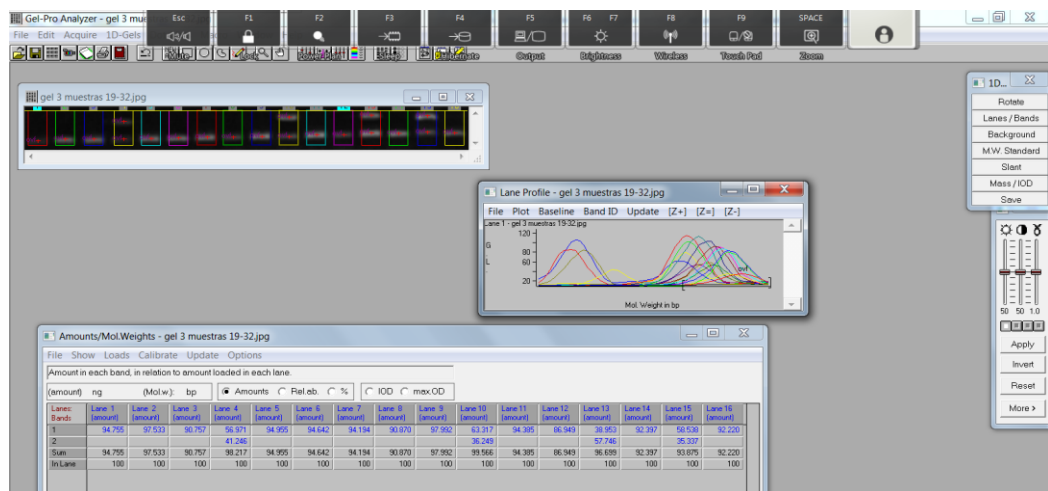
d) Análisis de muestras 50 a 63



Análisis de muestras de la 64 a 80



f) Análisis de muestras de la 81 a 94



**Anexo No 10:** Aclaratoria.

Los subtipos de *Escherichia coli* considerados en esta investigación son los pertenecientes al patotipo *Escherichia coli enteropatógena* (EPEC) exclusivamente, más no a todos los patotipos existentes de *E. coli*.

## BIBLIOGRAFÍA

- Ochoa Woodell, T. J. (2008). *Universidad Nacional Mayor de San Marcos*. Retrieved 12 de marzo de 2013 from [http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/speit/2006\\_n2/pdf/a03.pdf](http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/speit/2006_n2/pdf/a03.pdf)
- Esquivel , P., Lifschitz, V., & Medina, M. G. (12 de Abril de 2010). Caracterización molecular de aislamientos de Escherichia coli. *Revista Api* , 17-20.
- Nataro, J. P., & Karper, J. P. (2008). Diarrheagenic Escherichia coli. *Clinical Microbiology Reviews* , 144.
- Organización Mundial de la Salud. (2008). *Organización Mundial de la Salud*. Retrieved 15 de Febrero de 2013 from <http://www.who.int/features/qa/18/es/index.html>
- Hall, G. &. (2008). *Tratado de Fisiología Médica*. Santiago de Chile: Elsevier .
- Nicoletti, M., Superti, F., Conti, C., Calconi, A., & Zagaglia, C. (1987). Virulence Factors of Lactose-Negative Escherichia coli Strains Isolated from children with Diarrhea in Somalia. *Journal of Clinical Microbiology* , 524-529.
- Ezquível , P., Lifschitz, V., & Lösch, L. S. (2010). Caracterización molecular de aislamientos de Escherichia coli productores de diarrea en niños y adultos de la ciudad de Corrientes, Argentina. *Panam Infectol* , 17 - 21.
- Bern, C., Martinez, J., De Zoisa, I., & Glass, R. (2002). The Magnitude of the Global Problem of Diarrhoeal Disease. *Bull World Health Organ* , 705-714.
- Hannaoui Rodriguez, E. J. (2009). *Identificación por PCR y susceptibilidad antimicrobiana de cepas de Escherichia coli diarreogénicas, aisladas en niños con diarrea aguda en Cumaná. Venezuela*. Cumaná: Tesis.
- Trueba , G., & Vieira, N. (02 de Febrero de 2005). *High Prevalence of EIEC Isolated in a remote region of Northern Coastal Ecuador*. Retrieved 23 de Abril de 2013
- Mohamed, M. M., & Kamel Mohamed, A. Z. (2012). Molecular Characterization of Diarrheagenic Escherichia coli from libia. *The American Society of Tropical Medicine and Higiene* , 866 - 869.
- Ochoa, T. J., Mercado, E. H., & Durand, D. (2011). Frecuencia y patotipos de Escherichia coli Diarreogénica en Niños Peruanos con y sin diarrea. *Revista Perú Med Exp. Salud Publica* , 13 - 20.
- López Alvarez, J. M. (2010). *Escherichia coli: Mecanismos de patogenicidad*. Mexico: Departamento de Bacteriología UNAM.
- Catalina Pirez, M. (2010). *Journal of Microbiology*. Retrieved 18 de Septiembre de 2013 from <http://www.educa2.madrid.org/web/educamadrid/principal/files/6046b373-a0b6-4737-8f6b-4553dfefcd53/09.-%20Morfologia%20y%20estructura%20bacteriana.pdf>
- Ochoa, T. J., & Contreras, C. A. (2011). Enteropathogenic E.coli (EPEC) infection in children. *NIH-PA author Manuscript* , 478-783.
- López-Álvarez, J. (2010). Escherichia coli: Mecanismo de Patogenicidad. *Revista UNAM* , 1 - 10.

- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2010). *Microbiología Médica*. Bethesda, Maryland: Elsevier.
- Jhonson, T. J., & Nolan, L. K. (2009). Pathogenomics of the Virulence Plasmids of Escherichia coli. *Microbiology and Molecular Biology Review* , 750-790.
- Neto, F. U., & Scaletsky, C. (diciembre de 2004). *Journal of Clinical Microbiology*. Retrieved 12 de marzo de 2013 from <http://jcm.asm.org/content/42/12/5849.short>
- Dubreuil, D. J. (2014). The Whole Shebang: The Gastrointestinal Tract, Escherichia coli Enterotoxins and Secretion. *Microbiology Journal* , 73-76.
- Iguchi, A., Thomson, N., Ogura , Y., Saunders, D., & Ooka, T. (2009). Complete Genome Sequence and Comparative Genome Analysis of Enteropathogenic Escherichia. *Bacteriol* , 191-347.
- Rodriguez, G. (2008). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de Escherichia coli. *Salud Pública de Mexico Vol. 44* , 469.
- Afset, J. E., Bergh, K., & Bevanger, L. (2004). Association of atypical enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) with prolonged diarrhoea. *Journal of Medical Microbiology* , 1137 - 1144.
- Afset, J. E., Bergh, K., & Bevanger, L. (2003). High prevalence of atypical enteopathogenic Escherichia coli (EPEC) in Norwegian children with diarrhoea. *Journal of Medical Microbiology* , 1015 - 1019.
- Hernandez, R., Elias, W., & Vieira , M. (2009). An Overview of atypical and typical Enteropathogenic Escherichia coli. *FEMS Microbiol Lett* , 137-149.
- Mellies, J., Barron, A., & Carmona, A. (2007). Enteropathogenic and Enterohemorrhagic Escherichia coli Virulence Gene regulation . *Infect Immun* , 4199-4210.
- Hernández, R. T., Walder, E. P., & Vieira, M. A. (2009). An overview of atypical enteropathogenic Escherichia coli. *FEMS* , 137-149.
- Ochoa, T. J., Barletta, F., & Contreras, C. (2008). New insight into the epidemiologyof enteropathogenic Escherichia coli infection. *NIH Public Acces* , 1-4.
- Jafari, A., Aslani, M., & Bouzari, S. (2012). Escherichia coli: a brief review of diarrheagenic pathotypes and their role in diarrheal diseases in Iran. *Iran Journal of Microbiology* , 102-112.
- Contreras, C. A., Ochoa, T. J., Ruiz, J., & Lacher, D. W. (2012). Genetic diversity of locus of enterocyte effacement genes of enteropathogenic Escherichia coli isolated from Peruvian children. *Journal of Medical Microbiology* , 1114-1120.
- Medina, M., Esquivel, P., & Lifschitz, V. (2010). Detección de Escherichia coli diarreogénicos en niños de barrios humildes de Corrientes, Argentina. *Scielo* .
- Pritchard, W., & Lewis, K. (2012). *Union Hopsital*. Retrieved 12 de marzo de 2013 from <http://www.uhcc.com/Make-a-Gift>
- Barletta, F., Ochoa , T. J., & Mercado , E. (2011). Polymerasa Chain Reaction for Enteropathogenic Escherichia coli: a tool for investigation of asymptomatic versus symptomatic infections. *Infection Diseases Society of America* , 1223-1229.

Donnenberg, M. S., Tzipori, S., & McKee, M. L. (2008). The role of eae gene of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* in Intimate Attachment in vitro and in a porcine model. 1419-1421.

Hendriksen, R. S. (2003). PCR for identification of *Escherichia coli* toxins. *Global Salm Surv* , 1-22.

Water and Aquatic Sciences Research Program, Department of Biology, University of Victoria. (2014). Occurrence of diarrheagenic virulence genes and genetic diversity in *Escherichia coli* isolates from fecal material of various avian hosts in British Columbia, Canada. *Applied and Enviromental Microbiology* , 1933-1944.

INEN. (2010). *Ecuador en Cifras*. Retrieved 15 de Febrero de 2013 from [http://www.inec.gob.ec/estadisticas/?option=com\\_content&view=article&id=76&Itemid=48&TB\\_iframe=true&height=512&width=1236](http://www.inec.gob.ec/estadisticas/?option=com_content&view=article&id=76&Itemid=48&TB_iframe=true&height=512&width=1236)

Avilés Reyes, R. X., Aguas, L., Cardenas, B., Murillo, M., & Pablo, P. (2014). Determination of Specific gene of neurodegenerative diseases in Ecuadorian population. *Journal of Neurodegenerative Diseases* .

Avilés Reyes, R. X., Angelo, M., Villareal, A., & Rios, H. (2010). Intermittent hypoxia during sleep induces reactive gliosis and limited neuronal death in rats: implications for sleep apnea. *J Neurochem* , 854-869.

Liebchen, A., Benz, I., & Mellmann, A. (2011). Characterizartion of *Escherichia coli* strains isolated from patients with diarrhea in Sao Paulo, Brazil. *Journal of Clinical Microbiology* , 2274 - 2278.